

Aus dem Otto-Heubner-Centrum für Kinder-und Jugendmedizin
Klinik für Allgemeine Pädiatrie

DISSERTATION

Regeneration Adenovirus-spezifischer T-Zellen
nach allogener, hämatopoetischer Stammzelltransplantation bei
Kindern und Jugendlichen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Eida El-Mansorry

aus Libyen

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. G. Gaedicke
2. Prof. Dr. A. Salama
3. Prof. Dr. med. A. Kulozik

Datum der Promotion: 03.09.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Historisches	5
1.2	Adenoviren, Immunantwort and Transplantation	6
1.2.1	Biologie der Adenoviren	6
1.2.2	Infektionszyklus der Adenoviren	6
1.2.3	Inzidenz einer Adenovirusinfektion nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation	7
1.2.4	Nachweismethoden von Adenoviren	8
1.2.5	Klinische Manifestation der Adenovirusinfektion	8
1.2.6	Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT)	9
1.2.7	Therapiemöglichkeiten einer Adenovirusinfektion nach HSCT	10
1.3	Rekonstitution der spezifischen Immunität nach allogener HSCT	11
1.4	Thymusfunktion nach allogener HSCT	12
2	Ziele und Fragestellungen	15
3	Patienten, Material und Methoden	16
3.1	Patienten	16
3.2	Material	19
3.3	Methoden	20
3.3.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	20
3.3.2	Prinzip der intrazellulären Zytokinfärbung (Fast Immune Assay)	21
3.3.3	Praktische Durchführung der antigenspezifischen Stimulation	22
3.3.4	Praktische Durchführung der Fixierung	22
3.3.5	Praktische Durchführung der intrazellulären Zytokinfärbung	23
3.3.6	Prinzip der Bestimmung der CD4+ „Recent Thymic Emigrants“ (RTEs)	23
3.3.7	Praktische Durchführung der RTE-Bestimmung	24
3.4	Daten-Management und Statistik	24
4	Ergebnisse	27
4.1	Nachweis von AdV+ T-Zellen vor allogener HSCT	27
4.2	Verlauf der AdV+ T-Zell Antwort nach allogener HSCT	29
4.3	Korrelation der AdV+ T-Zell Antwort mit HSCT-Parametern	33
4.4	Korrelation von AdV+ T-Zellen und CD4+ RTEs nach HSCT	40
5	Diskussion	43

5.1	Methodenbeurteilung	43
5.2	Nachweis von AdV+ T-Zellen vor allogener HSCT	45
5.3	Verlauf der AdV+ T-Zell Antwort nach allogener HSCT	46
5.4	Korrelation der AdV+ T-Zell Antwort mit HSCT-Parametern	46
5.5	Korrelation der AdV+ T-Zellen und CD4+ RTEs nach HSCT	48
5.6	Konsequenz für adoptive, antivirale Therapiestrategien nach allogener HSCT bei Kindern und Jugendlichen	48
6	Zusammenfassung	49
7	Abkürzungsverzeichnis	50
8	Tabellenverzeichnis	51
9	Abbildungsverzeichnis	52
10	Literaturverzeichnis	54
11	Danksagung	64
12	Curriculum vitae	65
13	Erklärung	66

1 Einleitung

1.1 Historisches

In den letzten 20 Jahren wurden zahlreiche Tests entwickelt, um Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zellfunktionen analysieren zu können. In der Immunologie zählen zu diesen Verfahren Assays zur Charakterisierung, Quantifizierung, Isolierung und Expansion Antigen-spezifischer T-Zellen. Dabei sind Zielstrukturen von Interesse, die sowohl Tumorantigene als auch ein breites Spektrum von Krankheitserregern, vor allem Viren, umfassen [3, 21, 23, 37, 40, 63]. Die Charakterisierung solcher Zellen soll dazu dienen, die immunologische Auseinandersetzung mit diesen Zielstrukturen besser zu verstehen, aber auch Therapien zu entwickeln, bei denen Antigen-spezifische T-Zellen im Rahmen einer sog. adoptiven Therapie nach Transplantation zur Virusbekämpfung eingesetzt werden können. Die hier vorgelegte Arbeit befasst sich mit solchen T-Zellen gegen Adenoviren.

Seit Erstbeschreibung der Adenoviren in den frühen 50er Jahren des vergangenen Jahrhunderts sind diese Viren Gegenstand intensiver Forschung geworden [53]. Dazu gehört auch die Erkenntnis, dass Adenoviren nach allogenen, hämatopoetischen Stammzelltransplantationen ganz wesentlich zu Komplikationen beitragen, die das Leben der Patienten in den ersten Monaten nach Transplantation bedrohen [1, 7, 12, 14, 15, 16, 19, 30, 38, 44, 51, 55, 58, 62, 76, 81, 84, 89, 94, 96, 97, 102, 105, 106]. Der Erstkontakt zu dieser Virusgruppe findet bei bis zu 80 % aller Menschen in den ersten Lebensjahren statt und führt konsekutiv zu einer chronischen Virusträgerschaft. Das besonders hohe Risiko der Virusreaktivierung bei pädiatrischen Allograft-Empfängern wird darauf zurückgeführt, dass die Erstinfektion kürzer zurückliegt, dass noch ausgeprägte lymphatische Gewebe des Rachenrings ein ideales Reservoir für diese Viren darstellt und dass mit höherem Alter offensichtlich die chronische Virusträgerschaft überwunden werden kann [95, 102].

Die Adenovirus-Forschung beschäftigte sich vor allem mit der Virusstruktur, den verschiedenen Serotypen, der Epidemiologie und den Krankheitsbildern, aber auch der Nutzung von Adenoviren als Vektoren für den Gentransfer [3, 18, 20, 24, 26, 90, 103]. Dennoch bleiben zahlreiche Interaktionen zwischen der infizierten Zelle, den Virusgenprodukten und der Immunantwort des Wirtes ungeklärt.

1.2 Adenoviren, Immunantwort und Transplantation

1.2.1 Biologie der Adenoviren

Adenoviren besitzen ein Ikosaeder-förmiges Kapsid, bestehend aus 3 Hauptproteinen und zahlreichen anderen Proteinen. Das Genom humaner Adenoviren besteht aus 36000 Basenpaaren. Es enthält eine Doppelstrang-DNA mit terminalem Protein, das kovalent an das 5'-Ende gebunden ist und eine kodierte Protease enthält. Beim Menschen gibt es 53 verschiedene Serotypen, die auf der Basis von biochemischen bzw. biophysikalischen Eigenschaften in 6 Untergruppen von A bis F unterteilt sind. Der Adenovirus-Rezeptor ist identisch mit dem der Coxsackie Viren, dem sog. Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR). Es handelt sich um ein 46 kDa schweres Membran-Protein, dessen extrazellulärer Bereich eine kurze N-terminale Signalsequenz und zwei immunglobulinähnliche Domänen enthält [18, 90].

Bei den häufigsten Adenoviren handelt es sich um die Serotypen 1, 2, 5, 7 und 35 [18]. Da Adenoviren ihr Genom zum Zellkern transportieren und dort eine wirkungsvolle Replikation durchführen, sind sie Kandidaten für die Übertragung und Expression therapeutischer Gene [90].

Erstinfektionen sind endemisch im Kindes- und Jugendalter. Nach einer Infektion können Adenoviren latent im lymphatischen Gewebe bestehen bleiben [18, 95, 102]. Eine schwere Infektion kommt vor allem bei immungeschwächten Patienten vor und kann zu lebensbedrohliche Komplikationen führen. Während die Organotropie der verschiedenen Serotypen gut beschrieben ist [18], bleibt es Gegenstand der Forschung, inwieweit sich die serologischen und genetischen Eigenschaften zwischen immunkompetenten und insuffizienten Patienten – etwa HIV positiven Patienten – unterscheiden [24].

1.2.2 Infektionszyklus der Adenoviren

Der Infektionszyklus der Adenoviren ist aufgeteilt in 2 Phasen [90]. Die Phase 1 (= Frühphase) erstreckt sich über eine Dauer von etwa 6-8 Stunden, beginnend mit der initialen Interaktion des Virus mit dem Rezeptor. Ihre Funktion ist das Eindringen des Virus via Clathrin-vermittelter Endozytose in die Wirtszelle. Es folgt eine direkte Bindung der viralen, hitzesensiblen Pentonbase an die zellulären Integrine unter Anwesenheit von divalenten Kationen. Zu weiteren Aufgaben der Phase 1 gehören der schnelle Transport des Virusgenoms

durch Endosomen in das Zellzytoplasma und mit Hilfe von Dynein und Mikrotubuli durch eine Kernpore zum Nukleus. Dort wird es zur Kernmatrix geschleust. Ebenso fällt die Modulation der Zellfunktionen zur Vereinfachung der Replikation der Virus-DNA mit der darauf folgenden selektiven hocheffizienten Transkription und Translation in diese Phase. Das führt zu einer Ansammlung von Strukturproteinen im Nukleus und zur Reifung des infektiösen Virus. Die Transkription ist ein ebenfalls zweiphasiger Prozess, der sich - von zahlreichen Spaltprozessen begleitet - in eine Früh- und eine Spätphase aufteilt, beziehungsweise vor und nach der Virus-DNA-Replikation stattfindet. Die Replikation erfolgt von beiden DNA-Enden aus und benötigt Sequenzen innerhalb der „Inverted Terminal Repeats“ als Ausgangspunkt. Das führt zur Produktion von Strukturelementen des Virus, zur Kapselbildung und zur Reifung der Viruspartikel im Kern. Die Phase II (= Spätphase) umfasst einen Zeitraum von weiteren 4-6 Stunden, geht also schneller vonstatten als Phase I. Ihre Funktion ist die Freisetzung des Virus.

Interferone sind zelluläre Proteine der Größe 15-35 kDa, die in einer sehr frühen Phase einer Virusinfektion freigesetzt werden und einen gewissen Grad an Zellspezifität aufweisen. Sie werden in zwei Gruppen aufgeteilt, Gruppe I enthält ausschließlich α - und β - Interferone, zu Gruppe II werden γ -Interferone gerechnet. Ihre Aufgabe besteht in der Regulation der Virustranskription, somit sind sie Teil der zellulären Abwehrmechanismen gegen das Virus. Bei einer Adenovirusinfektion erfolgt die Induktion der Interferone über die Interaktion mit den Strukturbestandteilen. Generell sind Adenoviren aber widerstandsfähig gegen Interferone. Da sie selbst mit einer Anzahl von Abwehrmechanismen ausgestattet sind, induzieren sie so einen Interferon-Regulierungsfaktor im späteren Stadium der Infektion, der eine Rolle in der Zytogenität spielt.

1.2.3 Inzidenz einer Adenovirusinfektion nach allogener, hämatopoetischer Stammzelltransplantation

Die Inzidenzrate einer Adenovirusinfektion bei allogenen Transplantatempfängern wird je nach Studie mit 3 - 31 % angegeben [1, 7, 12, 14, 15, 16, 19, 30, 38, 44, 51, 55, 58, 62, 76, 81, 84, 89, 94, 96, 97, 102, 105, 106], wobei 83 % der Virusnachweise innerhalb der ersten 100 Tage nach Transplantation stattfinden. Die zunehmende Registrierung von Adenovirus-assoziierten Infektionen nach allogenen, hämatopoetischen Stammzelltransplantationen

hängt z. T. sicher mit den mittlerweile verbesserten, molekularen Detektionsmöglichkeiten zusammen [8, 20, 22, 52, 65, 69, 87, 103].

Im Vergleich zu erwachsenen Transplantatempfängern [62, 89] sind Adenovirusinfektionen bei pädiatrischen Patienten deutlich häufiger und liegen eher bei 30 % [7, 38, 44, 55, 69, 101]. Dabei liegt der Komplikationsbeginn in der Regel zwischen 30 - 90 Tagen nach Transplantation. Die höchste Inzidenz wurde bei Kindern bis 5 Jahren beobachtet [102]. Saisonale Häufigkeiten in bestimmten Monaten ließen sich nur in seltenen Fällen feststellen [103]. Alles deutet also darauf hin, dass es sich nicht um Neu- oder nosokomiale Infektionen, sondern in der Regel um Reaktivierungen einer chronischen Virusträgerschaft handelt.

1.2.4 Nachweismethoden von Adenoviren

Die üblichen serologischen Untersuchungen zum Nachweis einer Virusinfektion kommen bei immunkompromittierten Patienten nicht in Frage. Somit spielen heute qualitative und quantitative PCR-Untersuchungen in diversen Körperflüssigkeiten die entscheidende Rolle, die auch die Antigen-Bestimmungen (Komplementbindungstest, ELISA) wegen ihrer geringen Sensitivität und die Zellkulturverfahren als „Goldstandard“ wegen ihres technischen Aufwands und der längeren Nachweisdauer ersetzt haben [8, 20, 22, 52, 65, 69, 87, 103].

Bei der PCR werden Oligonukleotide benutzt, um Basensequenzen zu amplifizieren, die für das Adenovirus-Hexon-Protein bzw. die gruppenspezifischen Determinanten des Hexon-Proteins kodieren. Sie ist eine schnelle Technik und stellt ein sicheres Verfahren zum Nachweis einer disseminierten Infektion und ihres therapeutischen Ansprechens dar. Der Nachweis von Adenoviren gelingt dabei aus Stuhl- und Urinproben, Nasalsekret („nasal wash“), bronchoalveolärem Lavage-Material, Bindehaut-Abstrichen, Knochenmark- und peripheren Blutproben [18, 90]. Neuere Möglichkeiten zur Detektion von Adenoviren sind die „mRNA Reverse-Transkriptions-PCR“ und die „SYBR Green Real-Time-PCR“, mit denen es möglich ist, eine niedrige Frequenz von infektiösem Adenovirus in Flüssigkeiten, Schmutzwasser, Nahrung und Luft schnell und sensitiv, quantitativ nachzuweisen [57, 107].

1.2.5 Klinische Manifestation der Adenovirus-Infektion

Für die 6 Untergruppen der 53 humanen Adenoviren besteht bei Immungesunden eine gewisse Organotropie [18, 26], und die Infektion manifestiert sich vor allem im Bereich der

Atemwege, des Magen-Darm-Trakts, des Auges oder des Urogenitaltrakts in Form einer Bronchiolitis oder Pneumonie, einer Kolitis, Gastroenteritis, Hepatitis, oder Pankreatitis, einer Tonsillopharyngitis, einer Keratokonjunktivitis oder einer Myokarditis.

Nach allogener Stammzelltransplantation ist das klinische Bild der Adenovirusinfektion gravierender, von längerer Dauer und entspricht einem eher septischen Verlauf mit Fieber, hämorrhagischer Enteropathie und Zystitis, Hepatopathie und Atemwegsinfektionen, bis hin zur interstitiellen Pneumonie, die der Literatur nach in 6 – 60 %, bei Kindern im Durchschnitt in 30 % der Fälle zu einem letalen Multiorganversagen führt [1, 7, 12, 14, 19, 51, 55, 62, 79, 84, 89, 94, 96, 105, 106]. Eine mögliche Assoziation zwischen Graft-versus-Host Reaktion (GVHD) und Adenovirusinfektion wurde beschrieben, und es gibt Hinweise, dass die Virusreaktivierung den Trigger für eine GVHD darstellt [83]. Erschwert wird die Interpretation eines Zusammenhangs durch die Tatsache, dass in vielen Fällen mehr als ein Virus nachweisbar ist und andere kritische Viren aus der Gruppe der Herpesviren, wie das Epstein-Barr-Virus (EBV), das Zytomegalie-Virus (CMV) oder das Herpes hominis Typ 6 Virus (HHV-6) sehr ähnliche Komplikationen und histopathologische Infektionsbilder machen können [9, 19, 71, 83].

1.2.6 Allogene, hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT)

Nach anfänglichen, eher frustrierten Transplantationsversuchen in den 30er Jahren des vergangenen Jahrhunderts waren es Zentren, wie das „Fred Hutchinson Cancer Research Center in Seattle“ und andere, die in den letzten 30 – 40 Jahren die allogene Knochenmarktransplantation weltweit als Therapieverfahren für eine Vielzahl von ansonsten letalen Erkrankungen etabliert haben. Das betraf kongenitale und erworbene, benigne und maligne Störungen der Blutbildung, des Immunsystems und des Stoffwechsels [29]. Der HLA-genotypisch-identische Geschwisterspender war zunächst der „Goldstandard“. Um möglichst jedem potentiellen Patienten einen Spender zur Verfügung zu stellen, wurde zum einen versucht, durch Entwicklung von T-Zell-Depletionsverfahren des Transplantats auch HLA-differente Spender zu nutzen [4, 5, 6, 60], zum anderen ein weltweites Netz von Volontärspendern aufzubauen, das heutzutage die Identifikation eines HLA-kompatiblen Spenders in mehr als 80 % aller Fälle erlaubt. Zudem kam es über das Knochenmark (Knochenmarktransplantation, KMT) hinaus zu einer Diversifizierung der Stammzellquellen, nachdem es gelang, mit Zytokin-vermittelter Mobilisierung hämatopoetische Stammzellen aus dem peripheren Blut (periphere Blutstammzell-Transplantation, PBSCT) zu gewinnen,

oder auch blutbildende Stammzellen aus Nabelschnurblut Neugeborener (Nabelschnurblut-Transplantation, CBT) zu generieren. Seitdem hat sich für alle Verfahren der Überbegriff einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT) eingebürgert [29]. Allen Transplantationen gemeinsam ist, dass vor Übertragung der Spenderzellen mittels intravenöser Transfusion eine sog. chemo- oder radio-chemotherapeutische Konditionierung stattfinden muss, um die eigene Hämatopoese, das eigene Immunsystem und ggf. die residualen Tumor/Leukämiezellen zu eliminieren [29]. Nach Transplantation benötigt es in der Regel 2-4 Wochen, bis sich nach einer Aplasiephase eine ausreichende Spenderhämatopoese etabliert hat und damit Erythro-, Granulo- und Thrombopoese wieder ausreichend funktionieren. Komplizierter und langwieriger ist hingegen die lymphozytäre Immunrestitution, die ganz wesentlich die posttransplantären Risiken durch opportunistische Infektionen bestimmt. Details werden im Kapitel 1.3 beschrieben. Zu den besonders kritischen, von der Lymphozytenfunktion abhängigen Infektionsrisiken gehören die Pilze und Viren, bei letzteren die erwähnten Herpesviren EBV, CMV und HHV-6 sowie die Gruppe der Adenoviren.

1.2.7 Therapiemöglichkeiten einer Adenovirusinfektion nach HSCT

Nachdem für diese oben erwähnten und besonders kritischen Viren nach Transplantation im Vollbild einer Infektion keine ausreichend wirksame Therapie zur Verfügung steht, hat sich das Vorgehen einer „prä-emptiven“ Therapie eingebürgert. Ziel ist es, unmittelbar nach Detektion eines Virus und vor Beginn der schwerwiegenden Symptomatik mit einer Therapie zu beginnen. Dieses gilt auch für Adenoviren [10, 101, 105], für die zurzeit im Wesentlichen zwei Purin- bzw. Pyrimidin-Analoga in Frage kommen. Cidofovir ist ein nephrotoxisches Monophosphat-nukleotid-Analogon von Cytosin, das die virale DNA-Polymerase inhibiert, nachdem es durch intrazelluläre Phosphorylierung in seine aktive Diphosphatform überführt wird. Einige Studien sprechen sowohl für einen in-vitro Effekt, als auch eine Langzeitsuppression des Virus in-vivo und damit verbunden für eine Besserung der klinischen Symptomatik. Dennoch gibt es widersprüchliche Ergebnisse, und die Substanz ist limitiert durch ihre nephro- und myelotoxischen Nebenwirkungen [54, 64, 72]. Die zweite, häufig genutzte Substanz ist das Ribavirin [42, 61, 67, 78, 79], für das ebenfalls widersprüchliche Erfolgsraten berichtet werden, ohne dass gute kontrollierte Studien existieren. Alle anderen Virustatika und Immunglobulingaben spielen bei Adenoviren bisher keine belegte Rolle.

Einen neuen Therapieansatz stellen prophylaktische oder interventionelle Gaben von Antigen-spezifischen Spenderlymphozyten, sog. adoptive Therapien, bei zahlreichen opportunistischen Erregern dar [31, 40, 45, 50, 63, 75, 88]. Dieses Verfahren ist auch bei Adenoviren in der Erprobung, und erste klinische Studien sprechen für den sinnvollen Einsatz einer solchen Maßnahme [3, 15, 17, 35, 37, 46]. Im Rahmen dieser Studien ist es von höchstem Interesse, mehr Informationen über die spontane Rekonstitution der virusspezifischen Lymphozyten nach Transplantation zu gewinnen, und zu analysieren, inwieweit Virusreplikation und virusspezifische Immunität in einem quantitativen Verhältnis stehen.

1.3 Rekonstitution der spezifischen Immunität nach allogener HSCT

Die zelluläre Immunantwort zur Abwehr von Viren erfolgt über CD8 positive, zytotoxische T-Zellen und CD4 positive Helferzellen (Th1-Zellen). Sie benötigen hierzu Haupthistokompatibilitäts (MHC)-Antigene, die membranständige Moleküle darstellen, Antigene binden und auf diesem Weg den T-Lymphozyten präsentieren. Man unterscheidet dabei zwei Klassen von MHC-Antigenen. MHC-Klasse-I-Antigene werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und bestehen aus einer leichten und einer schweren Kette. Sie binden nur Antigene, die im Innern der Zelle synthetisiert werden (z.B. Virusproteine) und werden von CD8 positiven, zytotoxischen T-Zellen erkannt. Das führt zu einer Freisetzung von Perforin, die Zelle wird lysiert, und die infizierten Zellen werden schon in einem sehr frühen Stadium der Infektion eliminiert, bevor das Virus freigesetzt wurde [18, 90]. Adenoviren können durch das Zurückhalten der MHC-Antigene im endoplasmatischen Retikulum diesen Prozess hemmen. MHC-Klasse-II-Antigene werden von B-Lymphozyten, Phagozyten und Endothelzellen exprimiert. Sie bestehen aus zwei unterschiedlichen Polypeptidketten und präsentieren Antigene, die von außen (durch Phagozytose) aufgenommen und durch CD4 positive T-Zellen erkannt werden. CD4 positive Helferzellen (Th2-Zellen) stimulieren zudem nach Wiedererkennen eines spezifischen Epitops B-Zellen und setzen damit die spezifische, humorale Immunantwort in Gang.

Bei einer akuten Infektion steigt die Zahl der Antigen-spezifischen T-Zellen stark an, nach Bewältigung des Virus sinkt sie wieder. Die Anwesenheit von Antigen-spezifischen T-Zellen ist also ein Indikator für die Präsenz eines bestimmten Virus im Organismus [13, 95]. Anders gesprochen, bedeutet die Abwesenheit einer virusspezifischer Immunität entweder die hypothetische Abwesenheit des Virus oder eine pathologische Situation, in der das Virus anwesend ist, aber nicht kontrolliert werden kann. Die Adenovirus-spezifische T-Zell

Antwort sinkt im Alter. Nur bei 50 % aller Testpersonen einer Studie von Sester et al. [95] konnten Adenovirus-spezifische T-Zellen über einem bestimmten Limit erfasst werden, und die absoluten Zahlen waren bei jüngeren Testpersonen deutlich höher als bei den älteren. Dabei war der Abfall der T-Zell Antwort Virus-spezifisch und nicht durch den generellen Verlust von Gamma-Interferon produzierenden Zellen bedingt, da die proliferative T-Zell-Antwort gegenüber polyklonalen Stimuli - wie Staphylokokken Enterotoxin B - keine Altersabhängigkeit aufwies. Trotz des Abfalls der Adenovirus-spezifischen Immunantwort, der niedrigeren Gamma-Interferon Sekretion, der Verminderung der proliferativen Antwort und des Immunglobulin-G Titers, traten bei älteren Testpersonen dennoch seltener infektiöse Komplikationen auf. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass der Erreger im Laufe des Lebens eliminiert werden kann. Im Gegensatz dazu sind Komplikationen im jugendlichen Alter weitaus häufiger, was durch die höhere Primärinfektionsrate und Viruspersistenz erklärt werden kann. Dieses Virus-spezifische Altersmuster wiederholt sich prinzipiell auch bei immundefizienten Patienten nach allogenen Stammzelltransplantationen, bei denen die generelle T-Zell-Rekonstitution 3 – 6 Monate, die B-Zell-Rekonstitution bis zu einem Jahr benötigt und beide von zahlreichen Faktoren, wie Grundkrankheit, Art der Konditionierung, T-Zell-Depletion des Transplantats sowie Grad und Therapiebedürftigkeit einer akuten oder chronischen GVHD abhängig sind [32, 33, 34, 73, 74, 82, 92, 99]. Ungeklärt ist weiterhin, warum 30 % der pädiatrischen Patienten das Adenovirus reaktivieren, obwohl fast alle Kontakt zu dem Virus hatten, und was die ca. 60 – 70 % der Patienten auszeichnet, die mit der Virusreaktivierung zurechtkommen, während es beim Rest zu schwerwiegenden Komplikationen bis hin zum Multiorganversagen kommen kann. Ein Schlüssel zum Verständnis bot die Entwicklung sensitiver Assays zur Erfassung der Adenovirus-spezifischen, proliferativen T-Zell-Antwort. Hierbei stellte sich auch heraus, dass Adenovirus-spezifische CD4+ T-Zellen bezüglich der verschiedene Serotypen kreuzreagierend sind und die Mehrzahl der exponierten Personen langlebige, spezifische CD4+ T-Zellen gegen Adenoviren entwickelt [3, 17, 35, 36, 37, 39, 80, 101, 102].

Aus diesen einleitenden Erkenntnissen und noch ungeklärten Zusammenhängen ergaben sich die Ziele und Fragestellungen für die hier vorgelegten Untersuchungen.

1.4 Thymusfunktion nach allogener HSCT

Während nach allogener Transplantation das hämatopoetische System und die unspezifische, zelluläre Immunität (Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen) schnell rekonstituiert wird,

benötigt die vollständige Entwicklung der spezifischen, zellulären Immunität (B- und T-Zellen) 6 – 12 Monate.

Bei den noch lymphopenen Patienten nach Transplantation bestehen prinzipiell zwei Wege der T-Zell-Rekonstitution, eine Antigen-getriggerte, periphere Expansion reifer T-Zellen aus dem Transplantat sowie die de-novo Generierung naiver Zellen im Thymus aus den transplantierten, hämatopoetischen Vorläuferzellen [73, 74]. Der erste Weg führt zur Wiederherstellung von Gedächtnis-T-Zellen, deren Diversität des T-Zellrezeptor Repertoires von der Anzahl der T-Zellvorläufer im Transplantat abhängt. Der zweite Weg entspricht mehr der normalen Ontogenese der T-Zellen und führt zur kompletten Rekonstitution eines voll ausgereiften T-Zell Kompartiments.

Viele Studien konnten zeigen, dass in der frühen Regenerationsphase nach allogener Stammzelltransplantation periphere T-Zellen zunächst ein sehr eingeschränktes T-Zellrezeptor Repertoire aufweisen und Merkmale reifer, aktivierter T-Zellen tragen [32, 33, 34]. Das Muster hängt dabei von der Art des Transplantats und der Menge der übertragenen Stammzellen ab. Die Diversität und Komplexität des T-Zellrezeptor Repertoires nimmt erst zu, wenn naive T-Zellen im peripheren Blut auftauchen. Dies kann bei erwachsenen Patienten Monate bis Jahre dauern. Bei Kindern schreitet dieser Regenerationsprozess deutlich schneller voran, sodass sich das T-Zellrezeptor Repertoire nach ca. 6 Monaten bereits nicht mehr von dem einer gesunden Vergleichsperson unterscheidet. Aus diesen Daten wurde geschlossen, dass die von einem funktionstüchtigen Thymus abhängige T-Zell Rekonstitution bei Kindern in diesem Zeitraum rasch voranschreitet [27, 49]. Allerdings konnten mit den in diesen Studien verwendeten Techniken keine sicheren Aussagen über den exakten Beginn und das Ausmaß der Thymusauswurfleistung gemacht werden.

Aufgrund fehlender, spezifischer Marker für frisch aus dem Thymus emigrierte naive T-Zellen und der nicht eindeutigen Interpretation naiver T-Zellmarker im peripheren Blut bestanden bis vor kurzem noch Schwierigkeiten bei der präzisen Quantifizierung der Thymusfunktion. Neue Erkenntnisse über die Mechanismen der T-Zellreifung und der dabei stattfindenden Umlagerung der T-Zellrezeptor Gene haben zur Entwicklung des „T-Cell Receptor Rearrangement Excision Circles“ (TREC) Assays geführt, der eine gute Aussage zur Thymusfunktion nach allogenen Transplantationen erlaubt [2, 48, 56, 70, 100, 108]. Der Thymus bietet ein spezielles und für die Heranreifung normaler T-Lymphozyten essentielles Mikromilieu. Dabei findet eine Rekombination der Gene für die an der Zelloberfläche exprimierten T-Zell Rezeptoren statt und die Zellen durchlaufen dabei eine Umwandlung von

naiven in immunkompetente T-Lymphozyten. Dazu lernen die T-Zellen, körpereigene von fremden Peptiden zu unterscheiden. Sie durchwandern hierfür die Prozesse der positiven und negativen Selektion. Während der positiven Selektion werden die Thymozyten auf ihre Reaktionsfähigkeit mit körpereigenen HLA-Molekülen hin geprüft. Die negative Selektion beinhaltet die Prüfung und ggf. Elimination (Apoptose) von autoreaktiven Thymozyten, die körpereigene Eiweiße auf HLA-Molekülen erkennen. Im Laufe dieses Reifungsprozesses exprimieren die T-Lymphozyten verschiedene Oberflächenmarker. Anfangs sind die Vorstufen der T-Lymphozyten noch als CD3-/CD4-/CD8-/CD34⁺Zellen anzutreffen, um dann neben der CD3 Positivität zunächst CD4 und CD8 zu exprimieren und dann zu den hochspezialisierten, einfach positiven CD4 oder CD8 Zellen auszureifen.

Während der T-Zell Reifung im Thymus werden, wie bereits erwähnt, die Gene für den T-Zell Rezeptor an der Zelloberfläche umgelagert (Gen Rearrangement). Nicht benötigte Gen Abschnitte werden dabei ausgeschnitten. Bevor eine erfolgreiche Umlagerung des α -Lokus stattfinden kann, muss der in den α -Lokus eingestreute δ -Lokus deletiert werden. Dieser ausgeschnittene Gen Abschnitt lagert sich in der Folge ringförmig zusammen zu einem sogenannten „T-Cell-Receptor Rearrangement Excision Circle“ (TREC), ein extra-chromosomaler Ring aus DNA. T-Lymphozyten, die kürzlich den Thymus verlassen haben, besitzen genau einen TREC-Ring pro Zelle. Die TRECs sind stabil und kommen nur in T-Lymphozyten vor. Sie werden während der Mitose nicht vervielfältigt und so mit jedem Zyklus der Zellteilung verdünnt. TRECs sind somit Marker für die Entwicklung der T-Zellen im Thymus. Zur Evaluation der Thymus-Aktivität reicht dieser Parameter jedoch nicht aus, da bei gesteigerter zellulärer Proliferation durch den Verdünnungseffekt falsch negative Ergebnisse erwartet werden müssen.

Alternativ zum TREC-Assay können T-Lymphozyten, die gerade den Thymus verlassen haben, sog. „Recent Thymic Emigrants“ (RTEs) durchflusszytometrisch über die Koexpression von CD4 und CD31 schneller analysiert werden. Naive CD4⁺T-Zellen, die das CD31 Antigen exprimieren, enthalten einen hohen Anteil an TRECs als wichtigen Hinweis, dass es sich um eine vergleichbare Zellpopulation handelt [25, 28, 47, 49, 59]. In dieser Arbeit wurden CD4⁺CD31⁺CD62L⁺CD45RO⁻ T-Zellen zur Quantifizierung von RTEs herangezogen (s. Methoden).

2 Ziele und Fragestellungen

Die **Ziele** dieser Arbeit sind:

- (1) Bei pädiatrischen Allotransplantat-Empfängern die Regeneration Adenovirus-spezifischer T-Zellen mittels Analyse von Gamma-Interferon Sekretion und CD154- bzw. CD69 Expression nach Antigen-spezifischer Stimulation zu untersuchen,
- (2) die Thymusfunktion via CD4⁺RTEs Messung zu analysieren
- (3) und beides mit den klinischen Transplantations-Parametern, der Adenovirus Reaktivierung und den Komplikationen zu korrelieren.

Folgende **Fragestellungen** sollen dabei beantwortet werden:

- (1) Können Adenovirus-spezifische (AdV+) T-Zellen durch Nachweis der ex-vivo Aktivierung bei Kindern und Jugendlichen nach allogenen, hämatopoetischen Stammzelltransplantationen im Blut nachgewiesen und quantifiziert werden?
- (2) Wie ist die zeitliche und quantitative Entwicklung einer solchen spezifischen T-Zell-Antwort nach Transplantation?
- (3) Kann diese mit den Transplantationsparametern, der Virusreaktivierung und den Komplikationen korreliert werden?
- (4) Bieten Messungen der Thymusfunktion via CD4⁺RTEs zusätzliche Informationen?
- (5) Können diese Analysen einen Hinweis auf die benötigte Zahl Virus-spezifischer T-Zellen und den richtigen Applikationszeitpunkt für eine sichere Prophylaxe mittels adoptivem Transfers von Spenderlymphozyten bieten?

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Patienten

Analysiert wurden 26 konsekutive Kinder und Jugendliche, die im Zeitraum zwischen Februar 2007 und Juli 2008 an der Charité Berlin, Campus Virchow-Klinikum, eine allogene, hämatopoetische Stammzelltransplantation erhielten. Zum Zeitpunkt der Transplantation lag das Alter zwischen 8 Monaten und 25 Jahren (Median 6 Jahre). Das Alter der verwandten oder unverwandten Spender lag zwischen 7 und 50 Jahren (Median 30 Jahre). 69 % der Patienten war männlichen, 31 % weiblichen Geschlechts. Ausgenommen wurden Kinder, bei denen wegen der Grundkrankheit, fehlender Konditionierung oder spezieller Transplantationsart eine wesentlich abweichende Immunrestitution oder höhere Komplikationsrate zu erwarten waren (fortgeschrittenes Tumorstadium, SCID-Patienten ohne Konditionierung, HLA-haploidentische Transplantationen, Nabelschnurblut-Transplantationen). Die Diagnosen und wichtigsten Transplantationsparameter der Patienten sind in **Tabelle 1** dargestellt. Die Transplantationen erfolgten nach Vorgabe der multizentrischen Therapiestudien der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH). T-Zell-Depletionen bzw. Stammzellanreicherungen wurden bei allen Transplantaten durchgeführt, die mehr als 1 HLA-Differenz der relevanten, hochauflösend molekular getesteten Merkmale A, B, C, DRB1 und DQB1 aufwiesen. Drei Patienten (UPN 311, 314 und 334) benötigten im Untersuchungszeitraum bei schlechter Transplantatfunktion einen Stammzell-Boost vom selben Spender.

Seropositiv für Adenoviren waren erwartungsgemäß alle Spender und 22/26 Patienten. Bei der SCID-Patientin (UPN 327) war der Antikörperstatus wegen der Immundefizienz nicht bewertbar. Das Kind entwickelte im Rahmen der Transplantation einen AdV-Nachweis, sodass wahrscheinlich schon ein Erstkontakt stattgefunden hatte. Drei Kinder mit Malignomen waren vor Transplantation seronegativ (UPN 306, 330 und 333). Von diesen drei Kindern entwickelte ein Kind (UPN 333) nach Transplantation eine AdV-Infektion. Einschränkend müssen bei allen Malignom-Patienten unter Chemotherapie und allen Immundefekt-Patienten die Serostaten wegen der Immundefizienz oder der Plasmaproduktgaben kritisch bewertet werden. Alle Patienten erhielten eine antivirale Prophylaxe mit Aciclovir. Insgesamt ergaben sich hierunter im Untersuchungszeitraum folgende Virusreaktivierungen: CMV 9/26 (35 %), EBV 11/26 (42 %), AdV 8/26 (31 %) und HHV6 3/26 (12 %). Bei 5/26 Patienten (19 %) waren post transplantationem keine Viren, bei 12/26 (46 %) 1 Virus, bei 8/26 (31 %) 2 Viren und bei 1/26 Patienten (4 %) 3 Viren nachweisbar. Dabei ergaben sich

AdV-Nachweise mittels PCR im Blut, Nasenspülflüssigkeit, Stuhl oder Urin bei den Patienten UPN 311, 321, 325, 327, 328, 329, 331 und 333. Bei zwei Patienten mit Wiskott-Aldrich-Syndrom (UPN 311 und 321) waren die Adenoviren bereits vor Transplantation nachweisbar. Bei zweimaligem Virusnachweis von CMV, EBV oder AdV erhielten alle Patienten statt der Aciclovir Prophylaxe eine präemptive Therapie mit Ganciclovir bei CMV-, Foscavir bei EBV- und Cidofovir oder Ribavirin bei AdV-Nachweis. Alle später aufgeführten Transplantationskomplikationen sind also trotz dieser supportiven Therapie aufgetreten.

Unter diesen Vorgaben befanden sich 20/26 Patienten (77 %) während der Untersuchungszeit und auch zum Zeitpunkt der Einreichung der Dissertation in anhaltender Remission (CCR) der Grundkrankheit. Eine Patientin (UPN 328) rezidierte im Untersuchungszeitraum und verstarb in der Folge. Drei Patienten (UPN 325, 330 und 331) rezidierten oder zeigten einen Krankheitsprogress außerhalb des Untersuchungszeitraums. Zwei dieser Patienten sind verstorben, ein Patient (UPN 331) wurde retransplantiert und lebt in CCR. Zwei Patienten (8 %, UPN 326 und 334) verstarben jenseits des Untersuchungszeitraums an Transplantations assoziierten Komplikationen.

Eine akute Spender-gegen-Empfänger (GVHD) Reaktion trat bei 21/26 Patienten (81 %) auf und verlief als Grad I-II leicht bis moderat bei 20/26 (77 %). Lediglich bei einem Patienten (4 %, UPN 310) kam es zu einer ausgeprägteren Grad III Reaktion. Auch bei der chronischen GVHD kam es nur bei 3/26 Patienten (12 %, UPN 310, 326 und 330) zu dem ausgeprägteren Gesamt-Grad II.

Die Analysen der Immunrestitution erfolgten im Rahmen der ohnehin notwendigen, virologisch-immunologischen Routinekontrollen über einen zentralen, venösen Zugang. Über die zusätzlichen Untersuchungen an diesen Blutproben, die vor sowie im ersten halben Jahr monatlich nach HSCT im Rahmen des stationären Aufenthalts bzw. der Routinenachsorgen gewonnen wurden, waren die Patienten bzw. Erziehungsberechtigten informiert und hatten ihr schriftliches Einverständnis erteilt.

Tab. 1: Patienten- und Transplantationsdaten

	UPN	Sex	Alter (Jahr)	Diagnose	Transplantation	Konditionierung	GVHD-Prophylaxe
1	305	W	22	ALL CR3	MUD-PBSCT (CD34+)	TBI, Fludara, VP16	ATG, CSA
2	306	W	6	ALL PR2	MUD-KMT	TBI, VP16	ATG, CSA, MTX
3	307	M	5	ALL CR1	MRD-KMT	TBI, VP16	CSA, MMF
4	309	W	5	ALL CR2	MUD-PBSCT	TBI, VP16	ATG, CSA, MTX
5	310	M	17	AML (M4) PR2	MRD-KMT	Bu, Cy, Mel	CSA, MMF
6	311	M	1	WAS	MUD-PBSCT (CD34+)	Bu,Cy	ATG, CSA
7	313	M	6	ALL CR2	MUD-PBSCT	TBI, VP16	ATG, CSA, MTX
8	314	M	1	WAS	MUD-KMT	Bu, Cy	ATG, CSA, MTX
9	315	M	6	SAML (n.MDS)	MUD-KMT	Amsa, Fluara, TBI, Cy	ATG, CSA, MMF
10	319	M	17	CML CP1	MUD-KMT	Bu, Cy	ATG, CSA, MTX
11	320	W	10	FA (AA)	MUD-KMT	Fludara, Bu, Cy	Camp, CSA, MMF
12	321	M	2	WAS	MUD-KMT	Bu, Cy	ATG, CSA, MTX
13	322	M	17	MDS	MUD-PBSCT	Bu, Cy, Mel	ATG, CSA
14	323	M	26	SDS	MUD-KMT	Bu, Fludara, Cy	Camp, CSA
15	325	M	13	ALD	MUD-KMT	By, Cy	ATG, CSA, MMF
16	326	W	25	FA (MDS)	MUD-KMT	Fludara, Bu	ATG,OKT3, CSA
17	327	W	0,5	SCID	MUD-KMT	Fludara, Mel	ATG, CSA
18	328	W	12	AML (M4) CR2	MUD-PBSCT (CD34+)	Bu, Cy, Mel	ATG, CSA
19	329	W	3	JMML	MRD-KMT	Bu, Cy, Mel	CSA
20	330	M	9	LCAL CR2	MUD-KMT	TBI, TT, VP16	ATG, CSA, MTX
21	331	M	2	JMML	MUD-KMT	Bu, Cy, Mel	ATG, CSA
22	333	M	17	LCAL CR3	MUD-KMT	TBI, TT, VP16	ATG, CSA, MTX
23	334	M	12	FA (MDS)	MUD-KMT	Fludara, Bu	ATG,OKT3, CSA
24	336	M	6	AML (M2) CR1	MRD-KMT	Bu, Cy, Mel	CSA, MTX
25	337	M	6	ALD	MRD-KMT	Bu, Cy	ATG, CSA
26	342	M	5	ALL CR1	MUD-PBSCT	Bu, Cy, Mel	ATG, CSA, MTX

UPN = Patientennummer, M = männlich, W = weiblich, ALL = Akute lymphoblastische Leukämie, (s)AML = (Sekundäre) akute myeloische Leukämie (FAB Subtyp), CML = Chronisch myeloische Leukämie, MDS = Myelodysplastisches Syndrom, JMML = Juvenile myelomonozytäre Leukämie, LCAL = Großzellig anaplastisches Lymphom, FA = Fanconi Anämie in aplastischer (AA) oder myelodysplastischer (MDS) Phase, WAS = Wiskott-Aldrich-Syndrom, SCID = Schwere kombinierter Immundefekt, SDS = Shwachman-Diamond-Syndrom, ALD = X-chromosomale Adrenoleukodystrophie, CR = Komplette Remission, PR = Partielle Remission, CP = Chronische Phase, MRD = Familienspender, MUD = Unverwandter Spender, KMT = Knochenmarktransplantation, PBSCT (CD34+) = Periphere Blutstammzelltransplantation (ggf. mit Stammzellenanreicherung), TBI = Ganzkörperbestrahlung, VP16 = Etoposid, Fludara = Fludarabin, ATG = Antithymozytenglobulin Fresenius, Bu = Busulfan, Mel = Melphalan, Cy = Cyclophosphamid, Amsa = Amsacrin, Camp = MabCampath, OKT3 = monoklonaler Anti-T-Zell-Antikörper, CSA = Ciclosporin A, MTX = Methotrexat, MMF = Mycophenolatmofetil.

3.2 Material

Für die immunologischen Analysen wurden folgende Reagenzien bzw. Materialien verwendet:

- CD4 PerCP: (SK3) Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA, Cat.N°: 345770
- CD8 PerCP: (SK1) Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA; Cat N°: 345774
- CD14 FITC:(MφP9) Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA, Cat N°: 345784
- CD154 PE: (TRAP1) BD Pharmingen, USA, Cat N°: 555700
- INF γ APC: (B27) BD Pharmingen, USA, Cat N°: 554702
- CD69 PE: (L78) Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA, Cat N°: 341652
- CD28 Antikörper: BD Pharmingen, USA, Cat N°: 555725
- SEB (Staph. Enterotoxin B): Sigma Chemical, USA, Lot 090K4068, Cat N°: 11100-45-1
- AdV3-Hexon PepMix Lyophilized (25 μ g pro Peptid, 234 Einzelpeptide á 15 Aminosäuren, 11 überlappende Peptide): JPT Peptide Technologies GmbH, Deutschland, Cat.N°: P36849
- AdV3-Hexon PepMix Stammlösung: 1 Lyophilisat aufgelöst in 40 μ l DMSO 100 % und 60 μ l PBS Jerini.
- DMSO 100 %: Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland, Lot.N°: 26K2309
- Brefeldin A: Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland, Ref N°: 20350-15-6
- Beriglobin: ZLB Behring, Deutschland, Zulassungs-N°: 176a/92
- FACS-Röhrchen: (12x75), Becton Dickinson, USA, Cat.N°: 352052
- 15 ml Röhrchen: (99x16), Sarsted, Deutschland, Art. N°: 83.9923.943
- 15 ml Falcon Röhrchen: (17x120), Becton Dickinson, USA, Ref N°: 352097
- 50 ml Falcon-Röhrchen: (30x115), Becton Dickinson, USA, Ref.N°: 350270
- PBS-EDTA-Puffer: Miltenyi Biotec, Deutschland, Ref N°: 700-25
- FACSTM Lysen-Reagenz: Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA, Cat.N°: 349202
- FACSTM Permeabilizing Solution 2: Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA, Cat.N°: 340973
- CD4⁺ Recent Thymic Emigrant Enumeration Kit: Miltenyi Biotec, Deutschland, Lot N°: 5080729096.

Für die immunologischen Analysen wurden folgende Geräte verwendet:

- FACS-Calibur Durchflusszytometer, Becton Dickinson, Biosciences
- Software für Durchflusszytometer: Becton Dickinson, Cell Quest
- Zentrifuge: Heraeus Multifuge 4KR, Kendro
- Zentrifuge: 5415C, Eppendorf
- Vortex-Gerät: Mixer, Neolab 7-2020
- Brutschrank: +37 C°, 5 % CO₂, Labotect C 200.

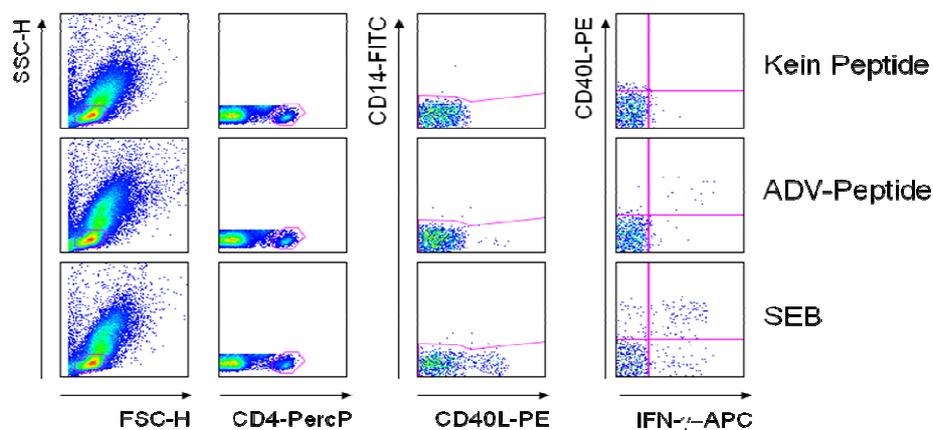
3.3 Methoden

3.3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die simultane Darstellung verschiedener Zellepitope in einer Zellsuspension auf Einzelzellebene. Die Suspension wird dazu von dem Messgerät mit Überdruck in eine Messküvette eingeführt, und die Zellen werden stark beschleunigt. Dabei trennen sich Aggregate auf und die Zellen können sequentiell durch einen Laserstrahl geführt werden. Dabei werden Streuungseffekte der Zellen und Fluoreszenzen der verwendeten fluoreszierenden Antikörper gemessen [85, 104]. Faktoren, die auf die Lichtstreuung Einfluss nehmen, sind Zellgröße, Struktur der Zellmembran und intrazelluläre Bestandteile. Das Vorwärtstreulicht (Forward Light Scatter, FCS) ist ein Maß für die Zellgröße, während das dazu im rechten Winkel gestreute Seitwärtslicht (Side Scatter, SSC) von der intrazellulären Granularität abhängt. Es ergibt sich in der Darstellung Seitwärtsstreulicht gegen Vorwärtstreulicht für Vollblut eine charakteristische Aufteilung der Zellen, in der Lymphozyten von Monozyten und Granulozyten unterschieden werden können. Zur immunologischen Phänotypisierung werden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern inkubiert, an die fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt sind. Verwendet man unterschiedlich markierte Antikörper, können mehrere Antigene auf einer Zelle gleichzeitig nachgewiesen werden. Voraussetzung dafür ist jedoch neben einer gemeinsamen Anregbarkeit der Farbstoffe bei einer bestimmten Wellenlänge, dass die Gipfel der einzelnen Emissionsmaxima deutlich unterschiedlich sind und so mit verschiedenen Detektoren getrennt voneinander in bestimmten Kanälen gemessen werden können. Moderne FACS-Geräte besitzen deshalb mehrere Laser mit unterschiedlicher Wellenlänge, sodass sich das Spektrum der gleichzeitig einsetzbaren Farbstoffe deutlich erweitert. Häufig verwendete Farbstoffe sind z. B. Fluoresceinisothiocyanid (FITC) , Phycoerythrin (PE), PerCP oder Allophycocyanin (APC).

Das für die Messungen dieser Arbeit verwendete Gerät arbeitet mit zwei Lasern, und es können bis zu vier verschiedene Farbstoffe gleichzeitig verwendet werden. Die Fluoreszenzintensität ist ein Maß für die Anzahl der gebundenen Antikörper auf der Zelle, Da die meisten Zellen auch ohne ein Anfärben eine gewisse Autofluoreszenz zeigen, muss immer eine Kontrolle der Zellen gemessen werden, damit festgelegt werden kann, ab welcher Fluoreszenzintensität die Zelle als positiv gilt, d.h. die Fluoreszenz auf den gebundenen Antikörper und den entsprechenden Farbstoff zurückgeführt werden kann. Es gibt unterschiedliche Darstellungsmöglichkeiten der Ergebnisse der Durchflusszytometrie. Zum einen die Dot Plot-Darstellung (siehe **Abbildung 1**), die in dieser Arbeit gewählt wurde. Dabei entspricht jeder Punkt einer Zelle. Im Density Plot werden die Zellen aufeinander dargestellt und die Farbunterschiede ausgewertet. Außer diesen beiden Darstellungen gibt es noch den Konturplot.

Abb 1: Dot Plot Darstellung einer Auswertung im Durchflusszytometer für die Expression Interferon- γ gegen CD154.



Kein Peptide = Negative Kontrolle, SEB = Staphylokokken Enterotoxin B = Positivkontrolle, ADV = Adenovirus-Peptide

3.3.2 Prinzip der intrazellulären Zytokinfärbung (Fast Immune Assay)

Das Ziel des „Fast Immune Assays“ besteht in der Detektion und Analyse von Lymphozyten, basierend auf der Sekretion von Zytokinen wie Gamma-Interferon (INF γ) oder auf der Basis von Aktivierungsmarkern wie CD154 (CD40L) oder CD69 [104]. Nach Stimulation mit dem Antigen kann auf diesem Weg eine Quantifizierung der Antigen-spezifischen T-Zellen

erfolgen. Um die Lymphozyten spezifisch zu aktivieren, wird die Zellprobe (Vollblut) mit einem spezifischen Antigen für 6-16 Stunden stimuliert. Das zugegebene Reagenz Brefeldin A verhindert, dass stimulatorische Zytokine oder Zelloberflächen-Adhäsions-Moleküle sezerniert oder an die Zelloberfläche transportiert werden. Dann werden die Zellen fixiert und mit einem Zytokin- bzw. Marker-spezifischen Antikörper versehen, der einen Farbstoff gebunden hat. Die so markierten Zellen werden dann im Durchflusszytometer analysiert.

3.3.3 Praktische Durchführung der antigenspezifischen Stimulation

Für die Antigen-spezifische Stimulation werden 3 Röhrchen mit je 1 ml Vollblut unter Zusatz von anti-CD28 Antikörper vorbereitet. Die Negativ-Kontrolle erhält keine weiteren Zusätze. Der Positiv-Kontrolle wird Staphylokokken Enterotoxin B (SEB, 1 µg/ml) zugegeben. In das dritte Röhrchen wird der AdV3-Hexon Peptid-Mix (2,5 µg/ml) gegeben. Dann erfolgt eine Inkubation bei +37°C im Brutschrank für 6-16 Stunden. 2 Stunden nach Beginn der Stimulation wird Brefeldin A (10µg/ml) zugegeben.

3.3.4 Praktische Durchführung der Fixierung

4-6 Stunden nach der Brefeldin A Zugabe und nach der vorgegebenen Gesamt-Inkubationszeit werden die 3 Proben (ADV, NO, SEB) gut durchgemischt, mit FACS-Lysen-Reagenz (1:10 verdünnt mit Aqua dest.) auf 10 ml aufgefüllt und für 10 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren und die Zellen zu fixieren. Danach werden die Proben 10 Minuten bei 300 g und +4°C zentrifugiert, und der Überstand wird vorsichtig abgeschüttet. Nachfolgend werden die 3 Proben jeweils mit 100 µl FACS Permeabilizing Reagenz (1:10 verdünnt mit Aqua dest.) bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert (als Detergenz zur Permeabilisierung der Zellmembran). Durch diesen Vorgang können die Antikörper zu den intrazellulären Strukturen vordringen ohne die morphologischen Zellcharakteristika zu verändern. Danach werden die Proben 10 Minuten bei 300 g und +20°C zentrifugiert, und der Überstand wird vorsichtig abgeschüttet. Dann wird jede Probe mit 1 ml Puffer versetzt, gut durchmischt und für die intrazelluläre Zytokinfärbung vorbereitet.

3.3.5 Praktische Durchführung der intrazellulären Zytokinfärbung

Die vorbereiteten Proben werden gut gemischt und auf je 3 FACS-Röhrchen zur Messung von CD4+ und CD8+ T-Zellen aufgeteilt, und zwar ohne Zugabe von AdV-Hexon-Peptid-Mix oder SEB als Negativkontrolle (**No Mix 1** für CD4+Zellen, **No Mix 2** für CD8+Zellen), mit Zugabe von SEB als Positivkontrolle (**SEB Mix 1** für CD4+Zellen, **SEB Mix 2** für CD8+Zellen) oder mit Zugabe von AdV-Hexon-Peptid-Mix (**ADV Mix 1** für CD4+Zellen, **AdV Mix 2** für CD8+Zellen). Nach Verrühren werden die Proben 5 Min. bei 500 g und +20°C zentrifugiert, der Überstand wird abgekippt und die Zellen werden in je 50 µl Farbmischung resuspendiert. Die benötigte Farbmischung wird zuvor nach folgendem Schema hergestellt (**Tabelle 2**).

Tab 2: Herstellung der Farbmischung

Antikörper	Mix 1 (200 µl) (CD4)	Mix 2 (200 µl) (CD8)
PE-CD69	∅	20 µl
PerCP-CD4	20 µl	∅
PerCP-CD8	∅	20 µl
PE-CD154	4 µl	∅
FITC-CD14	20 µl	20 µl
APC-INFγ	20 µl	20 µl
Beriglobin	4 µl	4 µl
Puffer	132 µl	116 µl

PE = Phycoerythrin, PerCP = Perdininchlorophyl Protein, APC = Allophycocyanin, FITC = Fluoreszein-isothiocyanid.

Dann erfolgt eine 30-minütige Inkubation in Dunkelheit bei Raumtemperatur. Nachfolgend werden die Proben mit Puffer aufgefüllt, 10 Minuten bei 300 g und +20°C zentrifugiert, und der Überstand wird abgeschüttet. Nach Zugabe von je 300 µl Puffer werden die Proben dann mit dem Durchflusszytometer gemessen.

3.3.6 Prinzip der Bestimmung von CD4+ „Recent Thymic Emigrants“ (RTEs)

Das Prinzip des „CD4+ Recent Thymic Emigrant (RTE) Kits“ ist der Nachweis humaner, naiver CD4+ T-Zellen, basierend auf der Expression von CD4, CD31, CD62L und der fehlenden Expression von CD45RO [59]. Zur RTE-Messung wird die Vollblutprobe mit den vorgemischten Farbstoffen für kurze Zeit inkubiert. Dann werden die Erythrozyten mit einem

Erythrozyten-Lyse-Reagenz lysiert, die Zellen zentrifugiert, fixiert und im Durchflusszytometer analysiert.

3.3.7 Praktische Durchführung der RTE Detektion

Je 100 µl Vollblut werden in zwei FACS-Röhrchen mit der Beschriftung A und B gegeben. In **Röhrchen A** werden 20 µl der CD4+RTE Farbmischung, in **Röhrchen B** 20 µl der Farb-Kontrolle nach folgendem Schema gegeben (**Tabelle 3**).

Tab. 3: Schema der Antikörperfärbung für die RTE-Bestimmung

CD4+RTE-Antikörper Röhrchen A	Kontroll-Antikörper Röhrchen B	Fluorochrom
CD4	CD4	FITC
CD31	Mouse IgG1	PE
CD45RO	Mouse IgG2a	PE-Cy5
CD62L	CD62L	APC

PE = Phycoerythrin, APC = Allophycocyanin, FITC = Fluoreszeinisothiocyanid. PE-Cy5 = Phycoerythrin-Cy5

Beide Röhrchen werden gemischt und für 10 Minuten bei +4°C inkubiert. Danach werden die Röhrchen mit Erythrozyten-Lyse-Reagenz auf 4 ml aufgefüllt, gemischt und für 10 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend werden die Proben 5 Minuten mit 500 g bei +20°C zentrifugiert, und der Überstand wird entfernt. Die Proben werden erneut mit Puffer aufgefüllt, 5 Minuten mit 500 g bei +20°C zentrifugiert und vom Überstand befreit. Abschließend werden 300 µl Puffer und 150 µl der Fixierungslösung in die Röhrchen gegeben, bevor sich die Analyse im Durchflusszytometer anschließt.

3.4 Daten-Management und Statistik

Untersucht wurde prospektiv eine Stichprobe von 26 konsekutiv an der Kinderklinik der Charité im Zeitraum vom Februar 2007 bis Juli 2008 allogenen transplantierten Kindern und Jugendlichen. Ausgenommen wurden bei den allogenen HSCT fortgeschrittene Leukämien mit hohem Rückfallrisiko, primäre Immundefekte ohne konditionierende Vorbehandlung, alle HLA-haploidentischen HSCT und alle Nabelschnurbluttransplantationen. Ebenfalls ausgenommen wurden alle autologen HSCT. Bei allen diesen, bei Kindern eher seltenen

Konditionen kann ein abweichendes, immunologisches Rekonstitutionsmuster angenommen werden.

Unter Berücksichtigung dieser Ein- bzw. Ausschlusskriterien war die Stichprobe einigermaßen repräsentativ für eine pädiatrische Transplantationsstation hinsichtlich der Transplantationsindikationen und Transplantatvarianten (siehe **Tabelle 4**). Etwas überrepräsentiert waren myeloische Leukämien/Präleukämien und primäre Immundefekte gegenüber den restlichen Indikationen, und unverwandte Transplantate gegenüber den sonstigen Spendervarianten. Letzteres entspricht der generellen Zunahme dieser Spenderwahl aufgrund der effektiveren, weltweiten Spenderbanken.

Tab. 4: Vergleich der Untersuchungsstichprobe mit allen an der Charité allogene transplantierten Kindern und Jugendlichen hinsichtlich der Grunddiagnose und Spenderwahl (Anzahl und Prozent)

	Stichprobe (N=26)		Gesamt allogene HSCT Charité (N=350)	
ALL/NHL	7	27 %	120	34 %
AML/CML/MDS	9	35 %	83	24 %
Fanconi Anämie	3	12 %	34	10 %
Metabolische Erkrankung	2	8 %	32	9 %
Primäre Immundefekte	5	19 %	29	8 %
MRD	5	19 %	94	27 %
MUD	21	81 %	199	57 %
KMT	19	73 %	216	62 %
PBSCT	7	27 %	114	33 %

HSCT = hämatopoetische Stammzelltransplantation, ALL = Akute lymphoblastische Leukämie, AML = Akute myeloische Leukämie, CML = Chronisch myeloische Leukämie, MDS = Myelodysplastisches Syndrom, MRD = Familienspender, MUD = Unverwandter Spender, KMT = Knochenmarktransplantation, PBSCT = Periphere Blutstammzelltransplantation

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe des Programms Excel sowie des Statistikprogramms SPSS, Version 18.0, für Windows. Nominal (Diagnose, Transplantationsart, Komplikationen, etc.) und ordinal skalierte Daten (z.B GVHD) wurden in der univariaten Datenbeschreibung als Häufigkeiten, die überwiegend nicht normalverteilten, metrischen Daten (absolute Zellzahlen) als Mediane (Lagemaß) und Minimal- und Maximalwerte sowie

Interquartilbereich als Streuungsmaß angegeben und mittels Box- und Whisker-Plots graphisch dargestellt. Bei der bivariaten Statistik wurden Medianvergleiche von Zellzahlen für zwei unabhängige Stichproben mittels des U-Tests nach Mann und Whitney bzw. für mehr als zwei unabhängige Stichproben mittels des Kruskal-Wallis-Tests getestet. Mittels des Korrelationskoeffizienten nach Pearson wurde der lineare Zusammenhang zwischen der Regeneration der CD4+RTEs- und der AdV-spezifischen T-Zellen geprüft und graphisch dargestellt. Mittels der Kaplan-Meier-Methode wurden Überlebenskurven bzw. kumulative Inzidenzen für bestimmte Komplikationen berechnet und mittels des Logrank Tests verglichen. Die vereinbarte Irrtumswahrscheinlichkeit lag bei $\alpha = 5\%$. Als Signifikanzniveau wurden Werte von $< 0,05$ mit einer Power von 80 % festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis von AdV+ T-Zellen vor allogener HSCT

Bei allen Patienten wurde die erste Analyse vor Transplantation durchgeführt, und zwar vor Beginn der konditionierenden Radiochemotherapie (siehe **Tabelle 5**). Nicht bei allen Patienten konnte davon ausgegangen werden, dass die Werte für AdV-spezifische T-Zellen der erwarteten „steady state“ Größenordnung eines gesunden Altersspektrums entsprach, da eine Alteration durch die immunologisch-hämatologische Grundkrankheit bzw. die vorangegangene Chemotherapie der malignen Erkrankung angenommen werden musste.

Tab. 5: Leukozytenfraktionen pro ml im peripheren Blut von Kindern und Jugendlichen vor Transplantation (N = 26)

Zellart	Median	Minimal	Maximal	Interquartilbereich
Leukozyten/ml [x 10E6]	4,29	0,82	29,00	5,23
Lymphozyten/ml [x 10E6]	1,29	0,27	15,50	1,49
CD4+ T-Zellen/ml [x 10E6]	0,45	0,02	5,45	0,52
CD4+IFN γ + T-Zellen/ml*	306	0	1947	738
CD4+CD154+ T-Zellen/ml*	241	0	19298	709
CD4+CD154+IFN γ + T-Zellen/ml*	131	0	823	270
CD8+ T-Zellen/ml [x 10E6]	0,31	0,04	6,82	0,33
CD8+IFN γ + T-Zellen/ml*	90	0	672	314
CD8+CD69+ T-Zellen/ml*	556	0	9407	1699
CD8+CD69+IFN γ + T-Zellen/ml*	10	0	403	86

*Nach spezifischer Stimulation mit Adenovirus-Hexon-Peptiden [Fast Immune Assay]

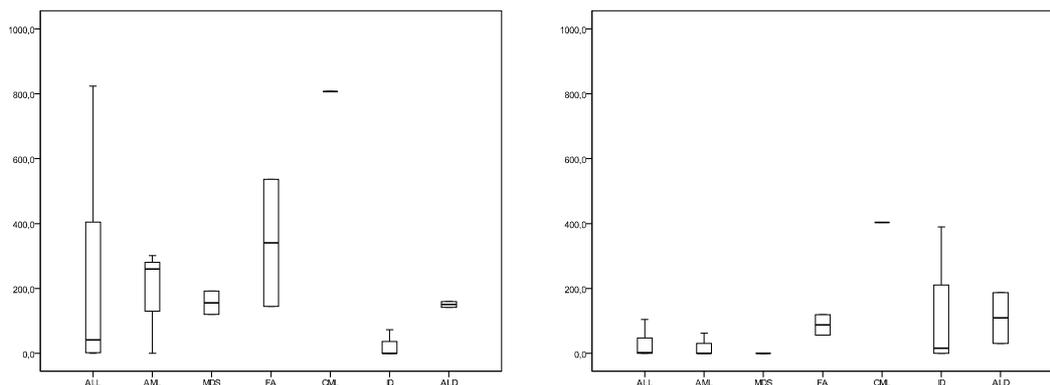
Die AdV-spezifische T-Zellzahl variierte je nach verwendetem Aktivierungsmarker. Dennoch waren prinzipiell bis auf eine Ausnahme (UPN 315) bei allen 22 Adenovirus seropositiven Patienten vor Transplantation spezifische CD4+ und/oder CD8+ T-Zellen nachweisbar. Die Frequenz der AdV-spezifischen CD4+ T-Zellen lag dabei in der Größenordnung von 0,09 % (Range: 0,01 – 1,40 %) aller CD4+ T-Zellen, bzw. 0,03 % (Range: 0,005 – 0,78 %) aller Lymphozyten oder 0,01 % (Range: 0,002 – 0,37 %) aller Leukozyten. Die Frequenz der AdV-spezifischen CD8+ T-Zellen lag bei 0,18 % (Range: 0,00 – 1,60 %) aller CD8+ T-Zellen,

bzw. 0,04 % (Range: 0,00 – 0,42 %) aller Lymphozyten oder 0,01 % (Range: 0,00 – 0,18 %) aller Leukozyten.

Bei dem SCID-Patienten (UPN 327) konnten erwartungsgemäß keine AdV-spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden, obwohl das Kind offensichtlich schon Adenovirus infiziert war. Bei zwei von drei, vermeintlich AdV-seronegativen Leukämie-Patienten ließen sich AdV-spezifische T-Zellen nachweisen (UPN 330 und 333). Bei einem dieser Patienten (UPN 333) kam es in der Folge zu einem Adenovirus-Nachweis. Bei beiden Patienten handelte es sich um rezidierte NHL-Patienten mit ausgeprägter, B-Zell-spezifischer Chemotherapie, sodass die Seronegativität hinterfragt werden muss.

In **Abbildung 2** sind die AdV-spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen bei verschiedenen Transplantationsindikationen vor Beginn der Konditionierung dargestellt. Dabei zeigte die Gruppe der primären Immundefekte die wenigsten spezifischen CD4+, aber durchaus spezifische CD8+T-Zellen. Dies betraf nicht den SCID-Patienten, sondern die Wiskott-Aldrich-Patienten, bei denen 2 von 3 bereits vor Transplantation Virusträger für Adenoviren waren.

Abb. 2: Adenovirus-spezifische CD4+CD154+IFN γ + (links) und CD8+CD69+IFN γ + T-Zellen/ml (rechts) bei Kindern und Jugendlichen mit verschiedenen Diagnosen vor allogener HSCT (Median, Minimal-/Maximalwerte und Interquartilbereich)



ALL = Akute lymphoblastische Leukämie, AML = Akute myeloische Leukämie, CML = Chronisch myeloische Leukämie, MDS = Myelodysplastisches Syndrom, FA = Fanconi Anämie, ID = primärer Immundefekt, ALD = X-chromosomale Adrenoleukodystrophie

4.2 Verlauf der AdV+ T-Zell Antwort nach allogener HSCT

In **Tabelle 6** sind die Verläufe der Leukozyten, Lymphozyten und Lymphozyten-Subfraktionen inkl. der virusspezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen pro ml peripheren Bluts in den ersten 6 Monaten nach allogener HSCT dargestellt.

In den folgenden **Abbildungen 3 – 6** sind zudem die Verläufe der AdV-spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen graphisch dargestellt.

Tab. 6: Verlauf der Leukozyten, Lymphozyten und Lymphozyten-Subfraktionen pro ml peripheren Bluts nach allogener HSCT (Median, Minimal-/Maximalwerte und Interquartilbereich)

1 Monat nach allogener HSCT				
Zellart	Median	Minimal	Maximal	Interquartilbereich
Leukozyten/ml [x 10E6]	4,02	1,45	10,90	4,05
Lymphozyten/ml [x 10E6]	0,62	0,28	2,34	0,64
CD4+ T-Zellen/ml [x 10E6]	0,12	0,02	0,71	0,68
CD4+IFN γ + T-Zellen/ml*	220	0	7285	1485
CD4+CD154+ T-Zellen/ml*	61	0	3549	1273
CD4+CD154+IFN γ + T-Zellen/ml*	48	0	2256	636
CD8+ T-Zellen/ml [x 10E6]	0,19	0,02	1,52	0,27
CD8+IFN γ + T-Zellen/ml*	0	0	10061	348
CD8+CD69+ T-Zellen/ml*	225	0	4934	821
CD8+CD69+IFN γ + T-Zellen/ml*	25	0	4858	244
2 Monate nach allogener HSCT				
Zellart	Median	Minimal	Maximal	Interquartilbereich
Leukozyten/ml [x 10E6]	3,60	1,40	10,07	4,05
Lymphozyten/ml [x 10E6]	0,82	0,15	2,92	1,15
CD4+ T-Zellen/ml [x 10E6]	0,10	0,01	0,56	0,13
CD4+IFN γ + T-Zellen/ml*	93	0	6849	829
CD4+CD154+ T-Zellen/ml*	899	37	7347	2678
CD4+CD154+IFN γ + T-Zellen/ml*	15	0	3602	208
CD8+ T-Zellen/ml [x 10E6]	0,31	0,02	1,69	0,57
CD8+IFN γ + T-Zellen/ml*	134	0	1199	693
CD8+CD69+ T-Zellen/ml*	420	0	531	132
CD8+CD69+IFN γ + T-Zellen/ml*	67	0	4858	244

3 Monate nach allogener HSCT				
Zellart	Median	Minimal	Maximal	Interquartilbereich
Leukozyten/ml [x 10E6]	5,15	0,19	14,39	3,71
Lymphozyten/ml [x 10E6]	0,95	0,13	2,43	0,77
CD4+ T-Zellen/ml [x 10E6]	0,11	0,00	0,80	0,11
CD4+IFN γ + T-Zellen/ml*	183	0	3449	1772
CD4+CD154+ T-Zellen/ml*	191	0	35400	1425
CD4+CD154+IFN γ + T-Zellen/ml*	57	0	1650	389
CD8+ T-Zellen/ml [x 10E6]	0,39	0,00	1,79	0,74
CD8+IFN γ + T-Zellen/ml*	240	0	11132	746
CD8+CD69+ T-Zellen/ml*	609	0	7986	1568
CD8+CD69+IFN γ + T-Zellen/ml*	168	0	1012	274
4 Monate nach allogener HSCT				
Zellart	Median	Minimal	Maximal	Interquartilbereich
Leukozyten/ml [x 10E6]	3,55	0,43	14,60	3,62
Lymphozyten/ml [x 10E6]	0,84	0,03	2,43	0,84
CD4+ T-Zellen/ml [x 10E6]	0,08	0,01	0,55	0,11
CD4+IFN γ + T-Zellen/ml*	224	10	1488	567
CD4+CD154+ T-Zellen/ml*	294	0	9102	2611
CD4+CD154+IFN γ + T-Zellen/ml*	75	0	777	122
CD8+ T-Zellen/ml [x 10E6]	0,40	0,03	1,65	0,64
CD8+IFN γ + T-Zellen/ml*	42	0	330	72
CD8+CD69+ T-Zellen/ml*	13	0	19280	785
CD8+CD69+IFN γ + T-Zellen/ml*	34	0	272	97
5 Monate nach allogener HSCT				
Zellart	Median	Minimal	Maximal	Interquartilbereich
Leukozyten/ml [x 10E6]	5,15	1,46	28,41	4,92
Lymphozyten/ml [x 10E6]	1,52	0,42	6,14	1,69
CD4+ T-Zellen/ml [x 10E6]	0,27	0,06	0,86	0,29
CD4+IFN γ + T-Zellen/ml*	402	12	3420	649
CD4+CD154+ T-Zellen/ml*	1034	0	8521	2206
CD4+CD154+IFN γ + T-Zellen/ml*	110	0	1140	441
CD8+ T-Zellen/ml [x 10E6]	0,72	0,10	3,99	1,02
CD8+IFN γ + T-Zellen/ml*	100	0	1428	358
CD8+CD69+ T-Zellen/ml*	3474	0	25581	15801
CD8+CD69+IFN γ + T-Zellen/ml*	65	0	482	186

6 Monate nach allogener HSCT				
Zellart	Median	Minimal	Maximal	Interquartilbereich
Leukozyten/ml [x 10E6]	5,65	2,90	14,20	3,28
Lymphozyten/ml [x 10E6]	1,51	0,42	5,47	1,52
CD4+ T-Zellen/ml [x 10E6]	0,31	0,05	0,87	0,20
CD4+IFN γ + T-Zellen/ml*	429	0	3399	928
CD4+CD154+ T-Zellen/ml*	1089	0	6322	3310
CD4+CD154+IFN γ + T-Zellen/ml*	244	0	1096	371
CD8+ T-Zellen/ml [x 10E6]	0,57	0,14	4,76	0,86
CD8+IFN γ + T-Zellen/ml*	228	0	8887	907
CD8+CD69+ T-Zellen/ml*	2051	0	29172	10516
CD8+CD69+IFN γ + T-Zellen/ml*	144	0	5686	260

*Nach spezifischer Stimulation mit Adenovirus-Hexon-Peptiden [Fast Immune Assay]

Abb. 3: Regenerationsverlauf Adenovirus-spezifischer CD4+IFN γ +T-Zellen/ml (links) und der CD4+CD154+IFN γ +T-Zellen/ml (rechts) bei Kindern und Jugendlichen vor und in den ersten 6 Monaten nach allogener HSCT (Median, Minimal-/Maximalwerte und Interquartilbereich)

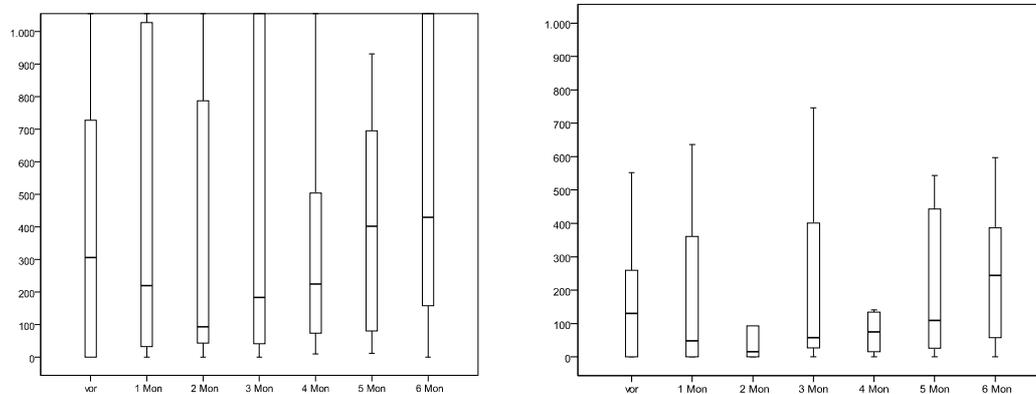


Abb. 4: Regenerationsverlauf Adenovirus-spezifischer CD8+IFN γ +T-Zellen/ml (links) und der CD8+CD69+IFN γ +T-Zellen/ml (rechts) bei Kindern und Jugendlichen vor und in den ersten 6 Monaten nach allogener HSCT (Median, Minimal-/Maximalwerte und Interquartilbereich)

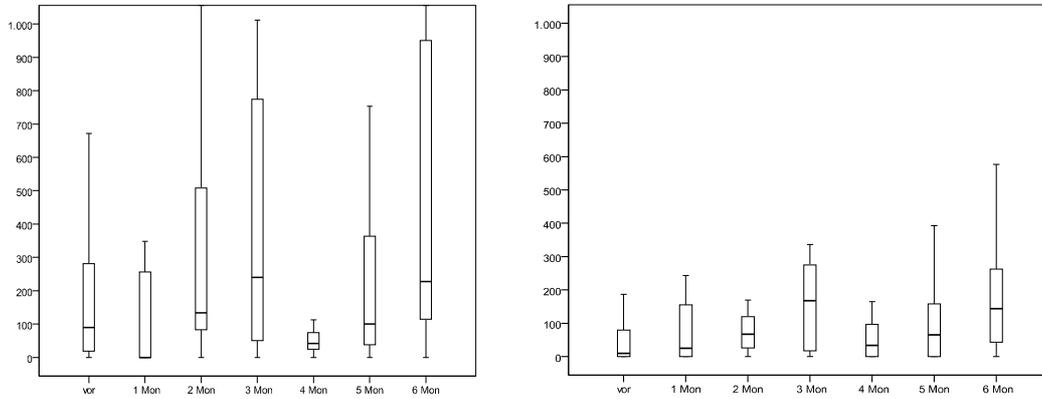


Abb. 5: Regenerationsverlauf Adenovirus-spezifischer CD4+CD154+IFN γ +T-Zellen/ml bei Kindern und Jugendlichen vor und in den ersten 6 Monaten nach allogener HSCT (Mediane)

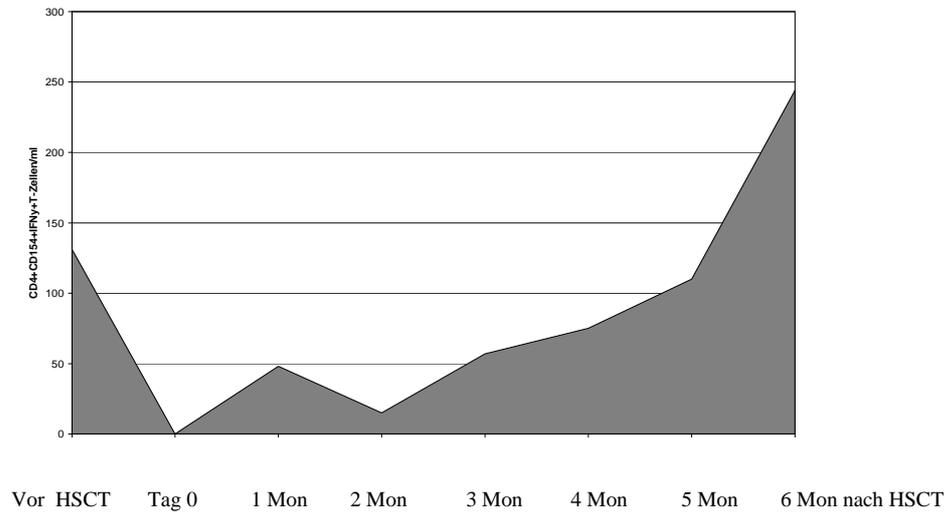
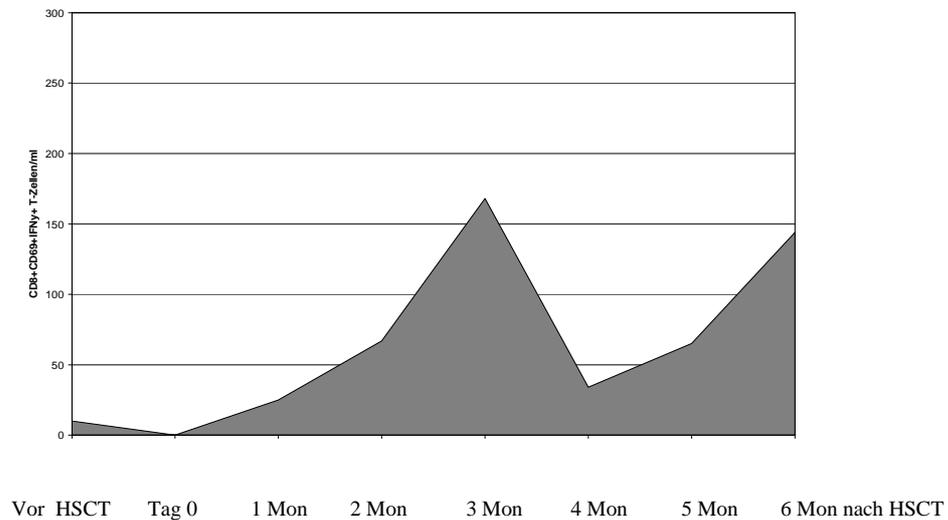


Abb. 6: Regenerationsverlauf Adenovirus-spezifischer CD8+CD69+IFN γ +T-Zellen/ml bei Kindern und Jugendlichen vor und in den ersten 6 Monaten nach allogener HSCT (Mediane)



Die Graphiken zeigen, dass trotz der individuell stark schwankenden und in der Höhe von den gewählten Aktivierungsmarkern abhängigen Werte ein erster Anstieg von AdV-spezifischen CD4+ Zellen in den ersten 1 – 2 Monaten nach HSCT zu verzeichnen ist, der am ehesten einem adoptiven Transfer-Effekt im Sinne einer peripheren Expansion reifer T-Zellen aus dem Transplantat darstellt. Ab dem 3. Monat nach HSCT setzt dann die aktive, de novo Regeneration der virusspezifischen Zellen ein und erreicht 6 Monate nach HSCT eine weitgehende Normalisierung. Bei den AdV-spezifischen CD8+ Zellen wiederholt sich dasselbe Muster mit einer ein- bis zweimonatigen Verzögerung.

4.3 Korrelation der AdV+ T-Zell Antwort mit HSCT-Parametern

Im Weiteren wurde univariat geprüft, welche Transplantationsparameter einen Einfluss auf die Regeneration der AdV-spezifischen T-Zell Antwort hatten. Die Ergebnisse 3 und 6 Monate nach allogener HSCT sind tabellarisch in den **Tabellen 7 und 8** sowie graphisch in den **Abbildungen 7 und 9** zusammengefasst.

Tab. 7: AdV-spezifische T-Zellen pro ml peripheren Bluts **3 Monate** nach allogener HSCT in Abhängigkeit von definierten Transplantationsparametern (Median und Interquartilbereich)

HSCT Parameter	CD4+CD154+IFN γ + T-Zellen/ml*		CD8+CD69+IFN γ + T-Zellen/ml*	
	Median	Interquartilbereich	Median	Interquartilbereich
ALL	30	228	166	216
AML	746	-	166	-
MDS	66	-	193	-
Fanconi Anämie	50	-	168	-
Immundefekt	401	-	172	-
Stoffwechseldefekt	128	-	163	-
MRD-KMT	109	403	550	-
MUD-KMT	47	435	67	107
MUD-PBSCT	40	610	30	-
Kein ATG vor HSCT	66	428	164	321
ATG vor HSCT	49	398	172	226
aGVHD 0-I	47	344	193	298
aGVHD \geq II	57	330	106	191
Kein Adenovirus-Nachweis	31	117	171	290
Adenovirus-Nachweis	426	1130	154	226
Adenovirus-Nachweis ohne Komplikationen	450	-	140	-
Adenovirus-Nachweis mit Komplikationen WHO $^{\circ}$ I-II	1026	-	86	-
Adenovirus-Nachweis mit Komplikationen WHO $^{\circ}$ III-IV	132	-	193	-

*Nach spezifischer Stimulation mit Adenovirus-Hexon-Peptiden [Fast Immune Assay]

Tab. 8: AdV-spezifische T-Zellen pro ml peripheren Bluts **6 Monate** nach allogener HSCT in Abhängigkeit von definierten Transplantationsparametern (Median und Interquartilbereich)

HSCT Parameter	CD4+CD154+IFN γ + T-Zellen/ml*		CD8+CD69+IFN γ + T-Zellen/ml*	
	Median	Interquartilbereich	Median	Interquartilbereich
ALL	77	349	86	466
AML	1051	-	182	-
MDS	168	-	144	-
Fanconi Anämie	280	-	75	-
Immundefekt	244	-	201	-
Stoffwechseldefekt	780	-	3008	-
MRD-KMT	168	740	144	2901
MUD-KMT	252	359	189	302
MUD-PBSCT	210	336	87	591
Kein ATG vor HSCT	166	597	144	216
ATG vor HSCT	261	356	147	355
aGVHD 0-I	187	386	179	323
aGVHD \geq II	261	719	100	294
cGVHD 0-I	244	378	176	263
cGVHD II	166	-	7	
Kein Adenovirus-Nachweis	105	375	61	205
Adenovirus-Nachweis	335	174	201	185
Adenovirus-Nachweis ohne Komplikationen	300	-	438	-
Adenovirus-Nachweis mit Komplikationen WHO $^{\circ}$ I-II	298	-	159	-
Adenovirus-Nachweis mit Komplikationen WHO $^{\circ}$ III-IV	419	-	176	-

*Nach spezifischer Stimulation mit Adenovirus-Hexon-Peptiden [Fast Immune Assay]

Abb. 7: Adenovirus-spezifische CD4+CD154+IFN γ +T-Zellen/ml (links) und CD8+CD69+IFN γ +T-Zellen/ml (rechts) bei Kindern und Jugendlichen **3 Monate** nach allogener HSCT in Abhängigkeit von molekularen Adenovirus-Nachweisen nach Transplantation (Median, Minimal-/Maximalwerte und Interquartilbereich)

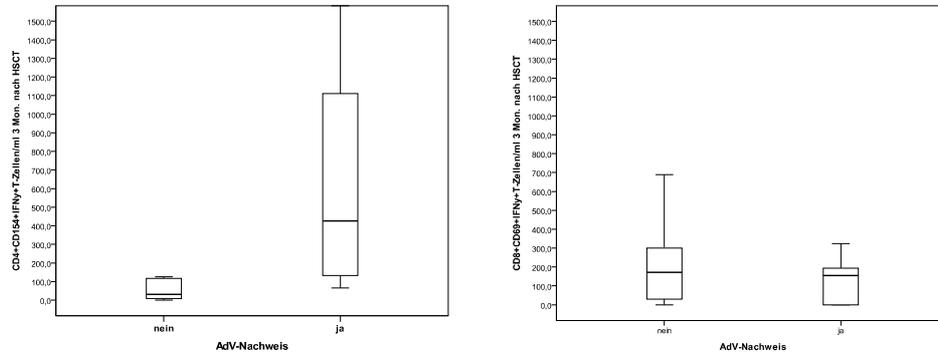


Abb. 8: Adenovirus-spezifische CD4+CD154+IFN γ +T-Zellen/ml (links) und CD8+CD69+IFN γ +T-Zellen/ml (rechts) bei Kindern und Jugendlichen **6 Monate** nach allogener HSCT in Abhängigkeit von molekularen Adenovirus-Nachweisen nach Transplantation (Median, Minimal-/Maximalwerte und Interquartilbereich)

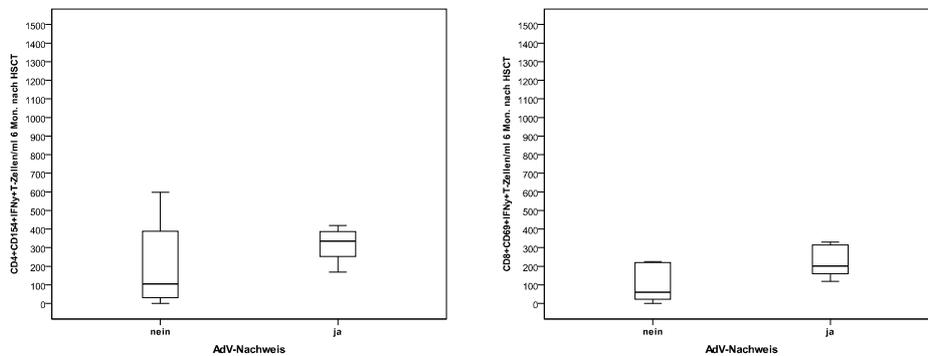


Abb. 9: Adenovirus-spezifische CD4+CD154+IFN γ +T-Zellen/ml bei Kindern und Jugendlichen mit molekularen Adenovirus-Nachweisen **3 Monate** (links) und **6 Monate** (rechts) nach allogener HSCT in Abhängigkeit vom Schweregrad der virus-assoziierten Komplikationen der Lunge, der Leber des Gastrointestinal- und/oder des Urogenitaltraktes (Median, Minimal-/Maximalwerte und Interquartilbereich)

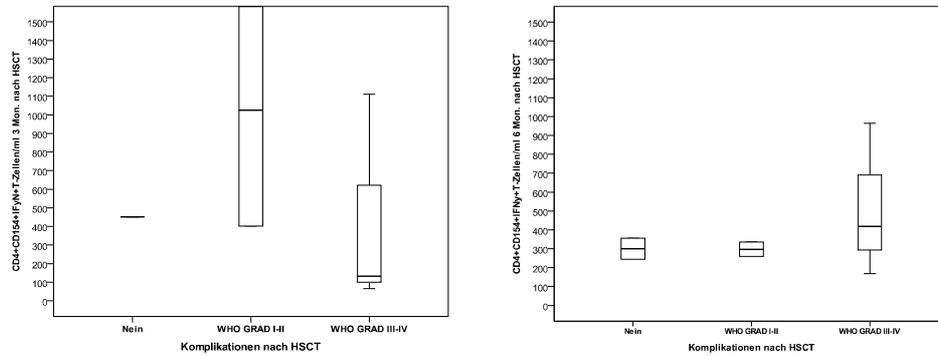
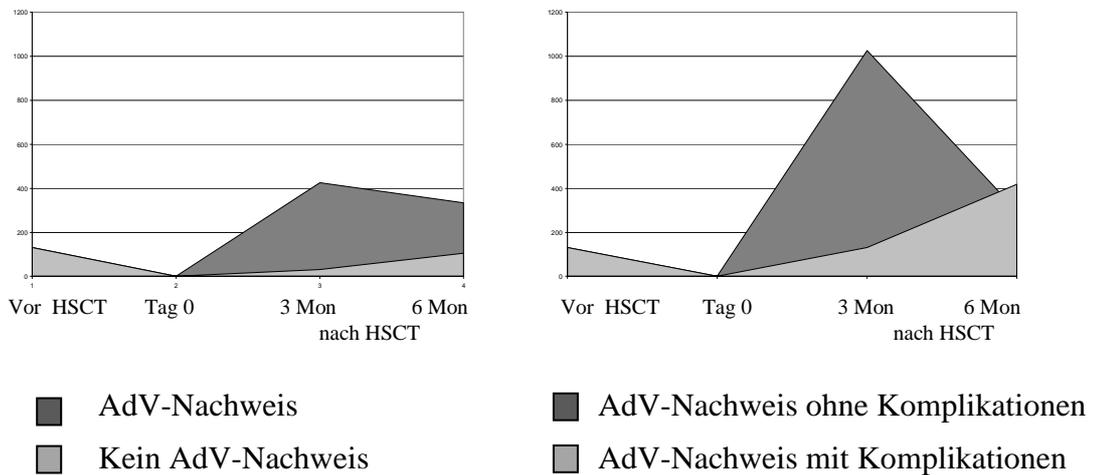


Abb. 10: Regenerationsverlauf der medianen, Adenovirus-spezifischen CD4+CD154+IFN γ +T-Zellen/ml bei Kindern und Jugendlichen (1) mit und ohne Adenovirus (AdV)-Nachweisen nach allogener HSCT (links) (2) mit Adenovirus-(AdV)Nachweisen und leichten oder schweren Komplikationen (rechts)



Bei dieser tabellarischen und graphischen Darstellung fallen folgende Trends auf. AdV-spezifische CD4+ T-Zellen variierten 3 Monate nach HSCT je nach Grundkrankheit. Zu diesem Zeitpunkt lagen sie nach HLA-genotypisch-identischen Geschwister-Transplantationen höher als nach unverwandten HSCT, während die Gabe oder Nichtgabe von ATG im Rahmen der Konditionierung und der Grad der akuten GVHD keinen Einfluss auf die Höhe dieser Zellen hatten. AdV-spezifische CD8+ T-Zellen waren 6 Monate nach HSCT besonders niedrig bei Patienten, die eine ausgeprägte chronische GVHD hatten. Ganz wesentlich war, dass die Patienten mit molekularen Adenovirus-Nachweisen nach Transplantation durchaus in der Lage waren, mit den AdV-spezifischen CD4+ T-Zellen zu reagieren, jedoch deutlich geringer bei den Patienten, bei denen dieser Virusnachweis mit schwerwiegenden Komplikationen verbunden war, als bei den Patienten mit keinen oder nur leichten klinischen Problemen (siehe **Abbildung 10**). Alle diese hypothetischen Aussagen und weitere Medianvergleiche wurden auf Signifikanz geprüft (siehe **Tabelle 9**). Dabei ergaben sich bei den z.T. niedrigen Fallzahlen der einzelnen Untergruppen signifikante Unterschiede lediglich für die AdV-spezifischen CD4+ Zellen 3 Monate nach HSCT bei Patienten mit und ohne AdV-Nachweis und schwach für die AdV-spezifischen CD8+ Zellen 6 Monate nach HSCT bei Patienten mit und ohne signifikante chronische GVHD. Erfreulich war, dass der AdV-spezifische T-Zell-Anstieg nicht bei Nachweis von Zytomegalie (CMV)- oder Epstein-Barr-Viren (EBV) zu verzeichnen war, was in der Tat für die in-vivo Spezifität dieser nachgewiesenen Zellen sprach. Interessanterweise gab es zudem einen schwach signifikanten Unterschied zwischen den Patienten-Geschlechtern für die AdV-spezifischen CD8+ Zellen 3 Monate nach HSCT.

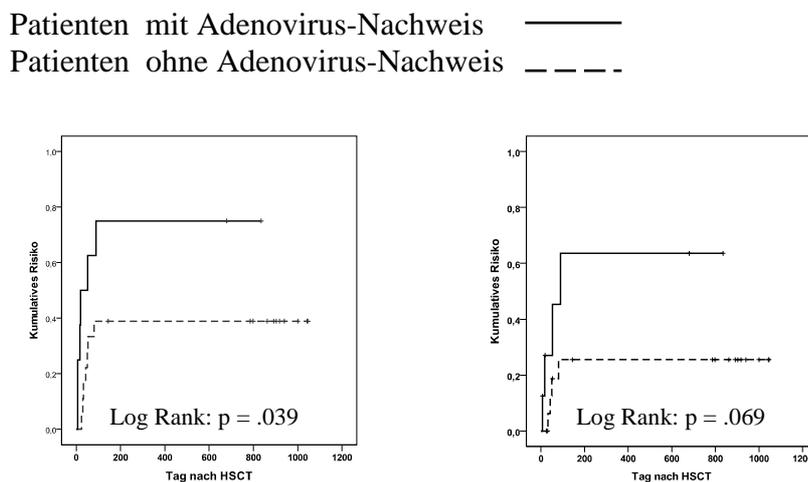
Tab. 9: Medianvergleich von CD4+CD154+IFN γ + und CD8+CD69+IFN γ + T-Zellen/ml für Kinder und Jugendliche 3 und 6 Monate nach allogener HSCT in Abhängigkeit verschiedener Transplantationsparameter (Signifikanzniveau)

HSCT Parameter	CD4+CD154+IFN γ + T-Zellen/ml		CD8+CD69+IFN γ + T-Zellen/ml	
	3 Monate	6 Monate	3 Monate	6 Monate
Grundkrankheit	.157	.239	.996	.181
Patienten-Geschlecht	.160	.151	.045	.528
Spender-Geschlecht	.437	.434	.501	.601
Spender/Stammzellquelle	.966	.905	.985	.989
T-Zell-Depletion	.864	.413	.646	.662
ATG-Gabe	.504	.351	.969	.601

Spender-Chimärismus	.165	.686	.475	.595
aGVHD	.475	.746	.4447	.590
cGVHD	.304	.743	.579	.049
Pneumonie	.157	.181	.304	.285
Hepatopathie	.171	.363	.665	.944
Gastroenteropathie	.731	.777	.149	.377
Zystitis	.701	.628	.392	.709
Multiorganversagen	.864	1.000	.301	.156
CMV-Nachweis	.396	.651	.457	.698
EBV-Nachweis	.713	.556	.440	.756
AdV-Nachweis	.008	.141	.505	.108
AdV-Nachweis mit und ohne schwere Komplikationen	.275	.480	.376	.724

Schließlich wurde mit der Kaplan-Meier Methode die kumulative Inzidenz von HSCT-Komplikationen in Abhängigkeit vom AdV-Nachweis errechnet (siehe **Abbildung 11**).

Abb. 11: Kumulative Inzidenz aller Komplikationen nach HSCT (links) und der schweren Komplikationen WHO Grad III-IV (rechts)



Die Abbildung zeigt, dass Adenovirus-Nachweise nach Transplantation nicht nur mit einer höheren Letalität, sondern auch signifikanten Komplikationen verbunden sind und dass der Risikozeitraum etwa 6 Monate beträgt, was gut zu der beschriebenen Regenerationszeit virusspezifischer T-Lymphozyten passt. Für die Berechnung von Überlebenskurven bzw.

kumulativen Risiken für die Adenovirus positiven Patienten in Abhängigkeit der AdV-spezifischen T-Zell-Zahlen waren die Fallzahlen zu klein.

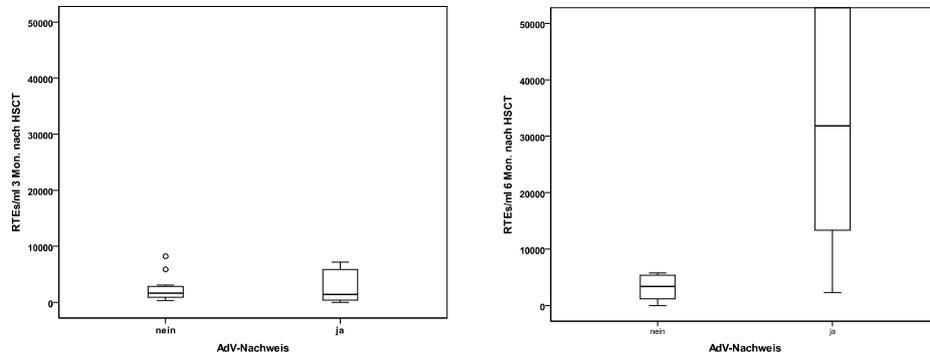
4.4 Korrelation von AdV+ T-Zellen und CD4+ RTEs nach HSCT

Zunächst wurden die „Recent Thymic Emigrants“ (RTEs) vor und monatlich nach allogener HSCT bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Regeneration etwa 2 – 3 Monate nach Transplantation einsetzt, dass aber auch 6 Monate nach Transplantation die Ausgangswerte bei weitem nicht erreicht sind (siehe **Tabelle 10**). Ähnlich, wie bei den AdV-spezifischen T-Zellen, kommt die Regeneration tendenziell schneller in Gang, wenn Adenoviren reaktiviert werden (siehe **Abbildung 12**). Aber auch hier erreicht der RTE-Unterschied allenfalls eine schwache Signifikanz 6 Monate nach allogener HSCT bei Kindern mit und ohne Adenovirusnachweis (siehe **Tabelle 11**).

Tab. 10: RTEs pro ml im peripheren Blut von Kindern und Jugendlichen vor und nach allogener HSCT (Median, Minimal-/ Maximalwerte und Interquartilbereich)

Zellart	Median	Minimal	Maximal	Interquartilbereich
Vor HSCT	93.055	6.930	691.980	436.273
1 Monat nach HSCT	390	0	2.960	1.500
2 Monate nach HSCT	620	0	5.880	2.025
3 Monate nach HSCT	1.640	0	8.220	3.811
4 Monate nach HSCT	1.230	0	120.080	5.218
5 Monate nach HSCT	2.700	0	147.060	25.780
6 Monate nach HSCT	3.930	0	196.240	62.005

Abb. 12: RTEs/ml bei Kindern und Jugendlichen mit und ohne molekularen Adenovirus-Nachweis **3 Monate** (links) und **6 Monate** (rechts) nach allogener HSCT (Median, Minimal-/Maximalwerte und Interquartilbereich)

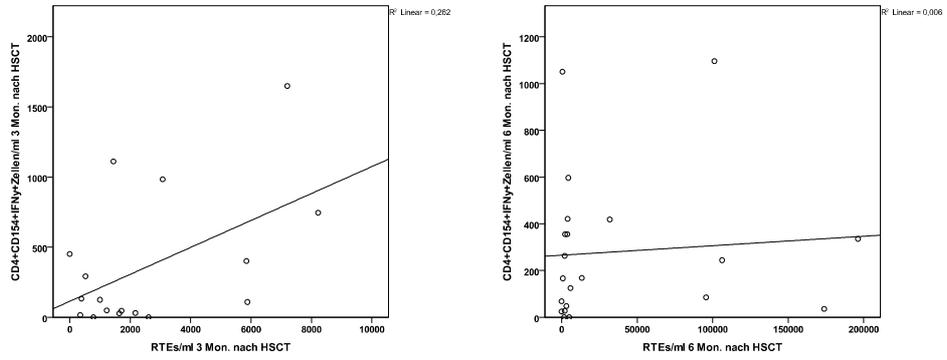


Tab. 11: Medianvergleich der RTEs/ml für Kinder und Jugendliche 3 und 6 Monate nach allogener HSCT mit und ohne Adenovirus-Nachweis bzw. Adenovirus assoziierten Komplikationen (Signifikanzniveau)

HSCT Parameter	RTEs/ml	
	3 Monate	6 Monate
AdV-Nachweis	.752	.047
AdV-Nachweis mit und ohne schwere Komplikationen	.564	.564

Bei der Korrelation nach Pearson ergab sich nur eine mäßige Beziehung zwischen den AdV-spezifischen CD4+Zellen und den RTEs 3 Monate nach allogener HSCT (Signifikanz: .036), keine signifikante Beziehung zwischen AdV-spezifischen CD4+Zellen und RTEs zu einem späteren Zeitpunkt (siehe **Abbildung 13**) und ebenfalls keine signifikante Beziehung zwischen AdV-spezifische CD8+Zellen und RTEs zu irgendeinem Zeitpunkt.

Abb. 13: Korrelation zwischen AdV-spezifischen CD4+Zellen und RTEs pro ml **3 Monate** (links) und **6 Monate** (rechts) nach allogener HSCT



5 Diskussion

Bei 26 konsekutiv an der Charité transplantierten Kindern und Jugendlichen mit diversen Grundkrankheiten wurden prospektiv vor und im ersten Halbjahr nach allogener, hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) Adenovirus-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie „Recent Thymic Emigrants“ (RTEs) mit gut etablierten Methoden im peripheren Blut bestimmt und mit relevanten Transplantationsparametern und infektiologischen Komplikationen korreliert. Dabei entsprach die Stichprobe hinsichtlich der Transplantationsindikationen und -parameter weitestgehend dem üblichen Spektrum einer pädiatrischen Transplantationsstation als auch dem der Gesamtgruppe von 350 Kindern und Jugendlichen, die an der Charité transplantiert worden waren.

5.1 Methodenbeurteilung

Im Vorfeld hatte sich die gewählte AdV3-Peptidmischung des Hexonproteins zusammen mit einem Anti-CD28-Antikörper bei gesunden Probanden als geeignet erwiesen, virusspezifische T-Lymphozyten zu stimulieren und anschließend durch Nachweis definierter Aktivierungsmarker durchflusszytometrisch zu detektieren (3). Dabei wurden zunächst die Zellen bestimmt, die Interferon- γ produzierten. Das Verfahren der intrazellulären Zytokinfärbung besitzt eine hohe Spezifität. Die Sensitivität hängt von der Permeabilisierung der Zellmembran ab, was unter anderem verlangt, die vorgegebenen Inkubationszeiten strikt einzuhalten. Weitere, für die Qualität der Messergebnisse bedeutsame Bedingungen sind nach Waldrop et al (104):

- Vermeidung von Apoptose-Effekten durch Einhalten kurzer Stimulations- und Inkubationszeiten,
- Steigerung der Sensitivität durch Anzucht in Kultur und hohe Fluoreszenz-Empfindlichkeit,
- Vermeidung von Stimuli, die eine unspezifische Interferon-Sekretion auslösen können,
- Vermeidung eines zu hohen Durchflusses an Zellen pro Sekunde während der Messung,
- und Vermeidung einer Autofluoreszenz-Fehlmessung durch Mitführen optischer Kontrollen.

Neben den Fehlermöglichkeiten der Analysemethoden bestanden zwei Probleme: Zum einen war zu erwarten, dass der prozentuale Anteil Virus-spezifischer T-Lymphozyten niedrig sein würde, und das besonders bei Patienten mit ohnehin reduzierter Zellularität vor und nach HSCT. Zum zweiten bestand die Frage, wie spezifisch die nachgewiesenen Zellen tatsächlich sein würden.

Die Immunität bei einer Virusinfektion hängt maßgeblich von der Aktivität der sogenannten Gedächtnis- oder Effektor-T-Zellen ab, deren funktionelle Heterogenität vor allem in ihrem Sekretionspotenzial von Zytokinen wie Interleukin 2 und Interferon- γ als Th1-Zellen und Interleukin 4 und Interleukin 10 als Th2-Zellen besteht. In den Arbeiten von Sester et al. [95] und Flomenberg et al [39] wird gezeigt, dass sich die Produktion von Th1-Zytokinen gut zum Nachweis spezifischer T-Zellen heranziehen lässt und dass die so gemessenen, virus-spezifischen T-Zellen während einer akuten Infektion dramatisch ansteigen und nach erfolgreicher Kontrolle des Virus durch das Immunsystem wieder absinken. Ein fehlender Nachweis bedeutet entweder die Abwesenheit des Virus oder eine schwerwiegende T-Zell-Defizienz.

Die Unterschiede in der Zytokinproduktion sind prinzipiell auf die Anzahl der Zellen zurückzuführen, die in der Lage sind, eine signifikante Menge dieser Zytokine zu produzieren. Auch wird vermutet, dass das Expressionspotenzial jedes einzelnen der Zytokine unabhängig voneinander reguliert und durch bestimmte Stimuli unterschiedlich stark aktiviert wird [85, 104]. Das ursprüngliche Einteilungssystem Th0, Th1 und Th2 reicht folglich nicht ganz aus, um das Spektrum der Komplexität der Zytokinsynthese zu erfassen. Durch die kurze Zeit der in-vitro Inkubation und der Sekretionsinhibition durch Brefeldin A vermindert sich das Risiko, dass T-Zellen oder akzessorische Zytokine die Zytokinantwort der T-Zellen verändern.

Die Durchflusszytometrie erlaubt zudem neben der Messung der Zytokin-Produktion den Nachweis einer Koexpression weiterer Epitope und damit die Zuordnung der Zytokinproduzierenden Zellen zu T-Zell-Subpopulationen. Auch weitere Aktivierungsmarker lassen sich gleichzeitig nachweisen, so etwa das CD69 oder CD154 (CD40L) Epitop. Letztere wurden in dieser Arbeit herangezogen, um die spezifisch aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu quantifizieren. Aus den Tabellen 5 und 6 wird ersichtlich, dass die Zellen, die Interferon γ produzierten und gleichzeitig entweder CD154 oder CD69 exprimierten, eine Teileinheit der Zellen darstellten, die nur eine der jeweiligen Aktivierungseigenschaften

aufwiesen. Nachdem der Unterschied dieser doppelt positiven Zellen bei Patienten mit und ohne Adenovirus-Nachweis am deutlichsten war, wurden schwergewichtig die CD4+CD154+IFN γ + und CD8+CD69+IFN γ + T-Zellen in die Analyse einbezogen, gefolgt von den Zellfraktionen, die ausschließlich Interferon γ produzierten. Die alleinige CD154 oder CD69 Expression war am schlechtesten mit dem in-vivo Nachweis von Adenoviren korreliert. Dabei ist gut bekannt, dass die qualitative und quantitative Expression von CD69 als auch CD154 als sehr frühe, unspezifische Aktivierungsmarker von T-Zellen stark abhängig von dem gewählten Stimulans und der Dauer der Stimulation ist [68, 91]. Der alleinige Zytokin-nachweis mittels des hier gewählten „Fast Immune Assays“ bietet die Vergleichsmöglichkeit mit anderen diagnostischen Zytokin-Assays, wie dem ELISPOT-Assay, aber auch mit Zellseparationsverfahren für Antigen-spezifische Zellen, wie dem „Cytokine Capture Assay“, der Anwendung in der adoptiven T-Zell Therapie findet.

5.2 Nachweis von AdV+ T-Zellen vor allogener HSCT

Prinzipiell ließen sich vor Transplantation bei allen Adenovirus-seropositiven Patienten AdV-spezifische CD4+ und CD8+ T-Zellen nachweisen. Die im Einzelfall inkohärenten Ergebnisse von AdV-spezifischen T-Zellen bei AdV-seronegativen Patienten oder fehlenden AdV-spezifischen T-Zellen bei AdV-seropositiven Patienten waren mit größter Wahrscheinlichkeit Grundkrankheits- bzw. Vortherapie bedingt. Der relative Anteil dieser Virus-spezifischen Zellen an der Lymphozyten- oder Leukozytenfraktion lag in dem erwarteten Bereich, mit absoluten Größenordnungen von 10^2 pro ml peripheren Bluts und Dominanz von CD4+ gegenüber CD8+ T-Zellen. Innerhalb der verschiedenen Krankheitsgruppen lagen die AdV-spezifischen Zellen in einer vergleichbaren Größenordnung. Möchte man die Werte mit Normalpersonen ohne akute Adenovirus-Infektion vergleichen, gibt die Literatur nur wenige Hinweise. In einer Arbeit von Sester et al [95] wurden die AdV-spezifischen Memory/ Effektor T-Zellen mit vergleichbarer Methodik bei normalen, AdV-seropositiven Probanden und Nierentransplantationspatienten ohne aktive AdV-Infektion bestimmt. Die Ergebnisse, auch die Spreitung der Werte, sind mit dieser Arbeit vergleichbar. Interessanterweise wurde ein deutlicher Abfall von AdV-spezifischen CD4+ T-Zellen bei Normalpersonen als auch bei Nierentransplantatempfängern jenseits des 40. Lebensjahrs gefunden. Das bedeutet, dass die AdV-spezifischen T-Zellen in der Gesamtgruppe AdV-seropositiver Probanden nur in 50 %, bei Probanden unter 39 Jahren jedoch in 88 % der Fälle oberhalb der Nachweisgrenze lagen.

Der altersabhängige Abfall der AdV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen korrelierte mit einem Abfall des Proliferationsindex, der Interferon γ Sekretion und des spezifischen IgG Titers. Diese Ergebnisse wurden interpretiert als Elimination des Pathogens im Alter, nachdem dieser Prozess virusspezifisch und mit anderen, polyklonalen Stimuli nicht reproduzierbar war, mithin nicht einem generellen Alterungsprozess des Immunsystems entsprach.

5.3 Verlauf der AdV⁺ T-Zell Antwort nach allogener HSCT

Die wichtigsten Ergebnisse der Analysen AdV-spezifischer T-Zellen nach allogener HSCT bei Kindern und Jugendlichen lassen sich, wie folgt, zusammenfassen. Erwartungsgemäß zeigten alle Patienten zunächst mit der konditionierungsbedingten Lymphopenie einen Abfall der AdV-spezifischen T-Zellen. Bei der Mehrzahl der nicht T-Zell depletierten Transplantate war im ersten Monat nach Transplantation zunächst ein passiver Transfer AdV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen aus dem Transplantat nachweisbar. Mit etwa 3 Monaten nach HSCT begann dann die aktive, de novo Produktion dieser Zellen, und mit 6 Monaten war eine weitgehende Normalisierung erreicht. Dieses Muster der AdV-spezifischen CD4⁺ T-Zell Regeneration wiederholte sich für die CD8⁺ T-Zellen mit einer Verzögerung von 1 – 2 Monaten. In der Literatur gibt es nur wenige Analysen dieser Art [36, 80]. In der Arbeit von Myers et al [80] wurden die AdV-spezifischen T-Zellen mit Hilfe des ELISPOT Assays bei 22 Kindern und Jugendlichen nach allogener HSCT verfolgt und mit 8 gesunden Probanden verglichen. Prinzipiell war das Rekonstitutionsmuster der dort beschriebenen Patienten mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbar. Die beschriebenen AdV-spezifischen T-Zellen lagen im Mittel zwischen 20 - 150 pro 1×10^6 peripheren, mononukleären Zellen. Das entsprach sehr gut den Größenordnungen der hier vorgelegten Ergebnisse, vor allem beim Vergleich mit den ausschließlich IFN γ ⁺ T-Zellen.

5.4 Korrelation der AdV⁺ T-Zell Antwort mit HSCT-Parametern

In der bereits erwähnten Arbeit von Myers et al [80] wurde eine deutlich schnellere Normalisierung der Virus-spezifischen T-Zellen bei HLA-genotypisch-identischen Geschwister-Transplantationen als bei unverwandten oder HLA-differenten Transplantaten beschrieben. Patienten mit Adenovirus-Reaktivierung waren in der Lage, mit den spezifischen T-Zellen

anzusteigen, aber nur die Patienten, bei denen es nicht zu schwerwiegenden, klinischen Komplikationen kam. Es ist schwierig zu ermessen, welcher Anstieg bei Virusinfektion adäquat und nötig wäre. Prinzipiell expandieren Antigen-spezifische T-Zellen massiv in Folge einer akuten Infektion, und zwar im Tierversuch von einer Größenordnung von 10^4 auf 10^8 , also um ca. 4 Zehnerpotenzen. Ein Teil dieser Zellen ist Virus-spezifisch, der Rest expandiert durch „Bystander“ Aktivierung [13]. Beim Menschen mit akuter Adenovirus-Infektion liegen kaum Daten vor. Wiederum in der Arbeit von Myers et al [80] wurden 8 Probanden als Kontrolle untersucht. Bei 3 dieser Probanden ließen sich Adenoviren im peripheren Blut nachweisen, allerdings ohne klinische Symptome einer Infektion. Diese ausschließliche Virämie war mit einer Erhöhung der AdV-spezifischen T-Zellen um das 2 – 3-fache verbunden.

Die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit bestätigen zunächst die zitierte Publikation von Myers et al [80], indem Patienten mit AdV-Reaktivierung in der Lage waren, zunächst mit den AdV-spezifischen CD4+ T-Zellen, dann auch mit den CD8+ T-Zellen anzusteigen. Tendenziell fehlte der adäquate Anstieg bei den Patienten, bei denen die AdV-Reaktivierung zu ernsthaften Infektionskomplikationen führte. Letzteres war wegen der kleinen Fallzahlen allerdings nicht oder noch nicht statistisch belegbar. Auch ergab sich tendenziell ein Unterschied zwischen Geschwistertransplantationen und solchen von unverwandten Spendern.

Neben diesen Kernaussagen fiel für die AdV-spezifischen CD8+ T-Zellen 3 Monate nach allogener HSCT ein schwach signifikanter Unterschied für das Patientengeschlecht auf, für den es keine gute Erklärung gibt, aber auch für Patienten mit ausgeprägter, chronischer GVHD, für den sicher die immunsuppressive GVHD-Therapie verantwortlich war.

Das Rekonstitutionsmuster der AdV-spezifischen T-Zellen unterschied sich zudem nicht bei den verschiedenen Grundkrankheiten, den Stammzellquellen und Patienten mit isolierten Komplikationen der wesentlichen Organe.

Erfreulicherweise ergab sich auch keine Unterschied der AdV-spezifischen T-Zellen bei Patienten mit anderen Virusnachweisen, wie CMV oder EBV, was für die in-vivo Spezifität der Analyse sprach.

5.5 Korrelation von AdV+ T-Zellen und CD4+ RTEs nach HSCT

Nachdem die Regeneration der CD4+ RTEs zunehmend als Parameter zur Einschätzung des Infektionsrisikos bei immunsupprimierten Patienten herangezogen wird [27, 28, 49], wurde mit dieser Arbeit zusätzlich geprüft, inwieweit die Bestimmung der RTEs ein Surrogat-Marker für die Antigen-spezifische T-Zell Regeneration nach allogener HSCT sein konnte.

Die Ergebnisse zeigten, dass – ähnlich wie die Virus-spezifischen T-Zellen – auch die RTEs nach Transplantation anstiegen, sich nach 6 Monaten aber bei weitem noch nicht normalisiert hatten. Auch zeigten Patienten mit Adenovirus-Reaktivierungen höhere RTE-Werte, vor allem 6 Monate nach Transplantation, als solche ohne Virus-Nachweis. Dennoch ergab sich keine gute Korrelation zwischen RTEs und AdV-spezifischen T-Zellen.

5.6 Konsequenz für adoptive, antivirale Therapiestrategien nach allogener HSCT

Geht man nach der hier vorgelegten Arbeit und der zitierten Literatur davon aus, dass unter den Bedingungen einer chronischen Adenovirus-Persistenz bei Kindern und Jugendlichen wenigstens ca. 500 AdV-spezifische T-Zellen pro ml – gemessen anhand der γ -Interferon Sekretion – zur Vermeidung von Krankheitszeichen benötigt werden, dann würde das für die prophylaktische Anwendung einer adoptiven Therapie bedeuten, AdV-spezifische T-Zellen in der Größenordnung von wenigstens $1 - 2 \times 10^6$ pro m^2 Körperoberfläche eines HSCT-Patienten zu transfundieren. Bei bereits vorhandenen Infektionszeichen würde der Bedarf höher liegen, wobei davon ausgegangen werden kann, dass die Applikation von AdV-spezifischen CD4+ T-Zellen in dieser Situation und je nach Zeitpunkt nach HSCT auch zu einer weiteren in-vivo Expansion dieser Zellen führen wird.

6 Zusammenfassung

Die Adenovirusinfektion nach allogener Stammzelltransplantation (HSCT) ist eine schwere Komplikation im Kindesalter mit hoher Morbidität und Mortalität. Für die Bewältigung der Infektion ist die Virus-spezifische T-Zell- Rekonstitution essentiell. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Regeneration Adenovirus (ADV)-spezifischer T-Zellen nach HSCT zu untersuchen. Analysiert wurde dabei der Einfluss der wichtigsten Transplantationsparameter, der Virusreaktivierungen und der Transplantationskomplikationen auf die Immunrekonstitution der spezifischen T-Zellen.

Hierfür wurden bei Kindern und Jugendlichen (Alter: 8 Monate bis 25 Jahre) vor und in den ersten 6 Monaten nach HSCT die AdV-spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen mittels des „Fast Immune Assays“ quantifiziert und mit der Rekonstitution der CD4+ „Recent Thymic Emigrants“ (RTEs) verglichen.

Dabei ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Frequenz AdV-spezifischer T-Zellen und der Adenovirus-Reaktivierung. Nachdem grundsätzlich etwa 6 Monate benötigt wurden, um nach allogener HSCT eine weitgehende Normalisierung dieser Virus-spezifischen T-Zellen und damit eine Beendigung des kritischen Infektionszeitraums zu erreichen, stiegen die AdV-spezifischen T-Zellen deutlich stärker bei Patienten an, bei denen eine Adenovirus-Reaktivierung vorlag, jedoch zu keinen schwerwiegenden Krankheitszeichen führte, während Patienten mit schwerwiegenden Infektionskomplikationen eine schlechte und offensichtlich inadäquate Rekonstitution dieser spezifischen T-Zellen aufwiesen.

CD4+RTEs stiegen nach allogener HSCT nur langsam an und hatten sich auch 6 Monate nach allogener HSCT noch nicht normalisiert. Zudem bestand keine gute Korrelation zwischen diesen RTEs und den AdV-spezifischen T-Zellen.

Zusammenfassend zeigte sich, dass AdV-spezifische T-Zellen in peripherem Blut vor und nach allogener HSCT bei Kindern und Jugendlichen mit den gewählten Nachweismethoden bestimmt werden konnten und einen Eindruck über den Bedarf dieser Zellen gaben, die zur Unterdrückung schwerwiegender Komplikationen nach Transplantationen benötigt werden.

Die Messung der Thymusfunktion konnte für die Adenovirus-spezifische Fragestellung keine zusätzlichen Informationen bieten.

7 Abkürzungsverzeichnis

AdV	Adenoviren
ALD	X-chromosomale Adrenoleukodystrophie
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ATG	Antithymozytenglobulin
CBT	Nabelschurbluttransplantation
CD	Cluster of Differentiation
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMV	Zytomegalie-Virus
CP	Chronische Phase
CR	Komplette Remission
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EBV	Epstein-Barr-Virus
FA	Fanconi Anämie
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung
GVHD	Graft-versus-Host Krankheit
HHV-6	Humanes Herpesvirus Type 6
HLA	Humanes Leukozyten Antigen System
HSCT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
ID	Primäre Immundefekte
IFN- γ	Gamma-Interferon
JMML	Juvenile myelomonozytäre Leukämie
KMT	Knochenmarktransplantation
LCAL	Großzellig anaplastisches Lymphom
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	Major-Histokompatibilitätskomplex
MRD	Matched Related Donor (HLA-identischer Familienspender)
MUD	Matched Unrelated Donor (HLA-identischer, unverwandter Spender)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PBSCT	Periphere Blutstammzelltransplantation
PR	Partielle Remission
RTEs	Recent Thymic Emigrants
SCID	Schwerer kombinierter Immundefekt
TREC	T-Cell Receptor Rearrangement Excision Circles
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
WAS	Wiskott-Aldrich-Syndrom

8 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1:** Patienten- und Transplantationsdaten
- Tab. 2:** Herstellung der Farbmischung
- Tab. 3:** Schema der Antikörperfärbung für die RTE-Bestimmung
- Tab. 4:** Vergleich der Untersuchungsstichprobe mit allen an der Charité allogenen transplantierten Kindern und Jugendlichen hinsichtlich der Grunddiagnose und Spenderwahl (Anzahl und Prozent)
- Tab. 5:** Leukozytenfraktionen pro ml im peripheren Blut von Kindern und Jugendlichen vor Transplantation (N = 26)
- Tab. 6:** Verlauf der Leukozyten, Lymphozyten und Lymphozyten-Subfraktionen pro ml peripheren Bluts nach allogener HSCT (Median, Minimal-/Maximalwerte und Interquartilbereich)
- Tab. 7:** AdV-spezifische T-Zellen pro ml peripheren Bluts 3 Monate nach allogener HSCT in Abhängigkeit von definierten Transplantationsparametern (Median und Interquartilbereich)
- Tab. 8:** AdV-spezifische T-Zellen pro ml peripheren Bluts 6 Monate nach allogener HSCT in Abhängigkeit von definierten Transplantationsparametern (Median und Interquartilbereich)
- Tab. 9:** Medianvergleich von CD4+CD154+IFN γ + und CD8+CD69+IFN γ + T-Zellen/ml für Kinder und Jugendliche 3 und 6 Monate nach allogener HSCT in Abhängigkeit verschiedener Transplantationsparameter (Signifikanzniveau)
- Tab. 10:** RTEs pro ml im peripheren Blut von Kindern und Jugendlichen vor und nach allogener HSCT (Median, Minimal-/Maximalwerte und Interquartilbereich)
- Tab. 11:** Medianvergleich der RTEs/ml für Kinder und Jugendliche 3 und 6 Monate nach allogener HSCT mit und ohne Adenovirus-Nachweis bzw. Adenovirus assoziierten Komplikationen (Signifikanzniveau)

9 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Dot Plot Darstellung einer Auswertung im Durchflusszytometer für die Expression Interferon- γ gegen CD154
- Abb. 2:** Adenovirus-spezifische CD4+CD154+IFN γ + (links) und CD8+CD69+IFN γ + T-Zellen/ml (rechts) bei Kindern und Jugendlichen mit verschiedenen Diagnosen vor allogener HSCT (Median, Minimal-/Maximalwerte und Interquartilbereich)
- Abb. 3:** Regenerationsverlauf Adenovirus-spezifischer CD4+IFN γ +T-Zellen/ml (links) und der CD4+CD154+IFN γ +T-Zellen/ml (rechts) bei Kindern und Jugendlichen vor und in den ersten 6 Monaten nach allogener HSCT (Median, Minimal-/Maximalwerte und Interquartilbereich)
- Abb. 4:** Regenerationsverlauf Adenovirus-spezifischer CD8+IFN γ +T-Zellen/ml (links) und der CD8+CD69+IFN γ +T-Zellen/ml (rechts) bei Kindern und Jugendlichen vor und in den ersten 6 Monaten nach allogener HSCT (Median, Minimal-/Maximalwerte und Interquartilbereich)
- Abb. 5:** Regenerationsverlauf Adenovirus-spezifischer CD4+CD154+IFN γ +T-Zellen/ml bei Kindern und Jugendlichen vor und in den ersten 6 Monaten nach allogener HSCT (Mediane)
- Abb. 6:** Regenerationsverlauf Adenovirus-spezifischer CD8+CD69+IFN γ +T-Zellen/ml bei Kindern und Jugendlichen vor und in den ersten 6 Monaten nach allogener HSCT (Mediane)
- Abb. 7:** Adenovirus-spezifische CD4+CD154+IFN γ +T-Zellen/ml (links) und CD8+CD69+IFN γ +T-Zellen/ml (rechts) bei Kindern und Jugendlichen 3 Monate nach allogener HSCT in Abhängigkeit von molekularen Adenovirus-Nachweisen nach Transplantation (Median, Minimal-/Maximalwerte und Interquartilbereich)
- Abb. 8:** Adenovirus-spezifische CD4+CD154+IFN γ + T-Zellen/ml (links) und CD8+CD69+IFN γ + T-Zellen/ml (rechts) bei Kindern und Jugendlichen 6 Monate nach allogener HSCT in Abhängigkeit von molekularen Adenovirus-Nachweisen nach Transplantation (Median, Minimal-/Maximalwerte und Interquartilbereich)
- Abb. 9:** Adenovirus-spezifische CD4+CD154+IFN γ +T-Zellen/ml bei Kindern und Jugendlichen mit molekularen Adenovirus-Nachweisen 3 Monate (links) und 6 Monate (rechts) nach allogener HSCT in Abhängigkeit vom Schweregrad der virus-assoziierten Komplikationen der Lunge, der Leber des Gastrointestinal- und/oder des Urogenitaltraktes (Median, Minimal-/Maximalwerte und Interquartilbereich)

- Abb. 10:** Regenerationsverlauf der medianen, Adenovirus-spezifischen CD4+CD154+IFN γ +T-Zellen/ml bei Kindern und Jugendlichen
- Abb. 11:** Kumulative Inzidenz aller Komplikationen nach HSCT (links) und der schweren Komplikationen WHO Grad III-IV (rechts)
- Abb. 12:** RTEs/ml bei Kindern und Jugendlichen mit und ohne molekularen Adenovirus-Nachweis 3 Monate (links) und 6 Monate (rechts) nach allogener HSCT (Median, Minimal-/Maximalwerte und Interquartilbereich)
- Abb. 13:** Korrelation zwischen AdV-spezifischen CD4+Zellen und RTEs pro ml 3 Monate (links) und 6 Monate (rechts) nach allogener HSCT.

10 Literaturverzeichnis

1. Akiyama H, Kurosu T, Sakashita C, et al (2001) Adenovirus is a key in hemorrhagic cystitis associated with bone marrow transplantation. *Clin Infect Dis* 32: 1325-30
2. Aquino VM, Douek DC, Berryman B, et al (2003) Evaluation of thymic output by measurement of T-cell-receptor gene rearrangement excisional circles (TREC) in patients who have received fludarabine. *Leuk Lymphoma* 44: 343-8
3. Arbach O, Frentsch M, Chmielewicz B, et al (2006) Targeting adenovirus by adoptive immunotherapy: adenovirus capsid hexon as target protein of adenovirus-specific CD4+ T-cells. *Bone Marrow Transplant* 37 (Suppl 1): S 190
4. Aristei C, Aversa F, Raymondi C, et al (1996) Allogeneic matched T-cell depleted bone marrow transplantation for acute leukemia patients. *Cancer J Sci Am* 2: 330-4
5. Aversa F, Tabilio A, Terenzi A, et al (1994) Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical \square three-loci \square incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood* 84: 3948-55
6. Aversa F, Terenzi A, Carotti A, et al (1999) Improved outcome with T-cell depleted bone marrow transplantation for acute leukemia. *J Clin Oncol* 17: 1545-50
7. Baldwin A, Kingman H, Darville M, et al (2000) Outcome and clinical course of 100 patients with adenovirus infection following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 26: 1333-8
8. Banyai K, Mate Z, Adam E, et al (2003) Screening adenoviruses in stool samples: evaluation of a specific monoclonal antibody based enzyme immunoassay. *Acta Microbiol Immunol Hung* 50: 23-32
9. Barbera JA, Martin-Campos JM, Ribalta T, et al (1996) Undetected viral infection in diffuse alveolar damage associated with bone marrow transplantation. *Eur Respir J* 9: 1195-200
10. Bordigoni P, Carret AS, Venard V, et al (2001) Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 32: 1290-7

11. Broers AE, Posthumus-van Sluijs SJ, Spits H, et al (2003) Interleukin-7 improves T-cell recovery after experimental T-cell depleted bone marrow transplantation in T-cell deficient mice by strong expansion of recent thymic emigrants. *Blood* 102: 1534-40
12. Bruno B, Zager RA, Boeckh MJ, et al (2004) Adenovirus nephritis in hematopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation* 77: 1049-57
13. Butz EA, Bevan MJ (1998) Massive expansion of antigen-specific CD8+ T cells during an acute virus infection. *Immunity* 8: 167-75
14. Carrigan DR (1997) Adenovirus infection in immunocompromised patients. *Am J Med* 102: 71-4
15. Chakrabarti S, Collingham KE, Fegan CD, et al (2000) Adenovirus infections following haematopoietic stem cell transplantation: is there a role for adoptive immunotherapy? *Bone Marrow Transplant* 26: 305-7
16. Chakrabarti S, Mautner V, Osman H (2002) Adenovirus infections following allogeneic stem cell transplantation: Incidence and outcome in relation to graft manipulation, immunosuppression, and immune recovery. *Blood* 100: 1619-27
17. Chatziandreu I, Gilmour KC, Mcnicol AM, et al (2007) Capture and generation of adenovirus specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Haematol* 136: 117-26
18. Cherry JD (1998) Adenoviruses. In: Feigin R, Cherry JD (eds), *Textbook of pediatric infectious diseases*, Saunders, Philadelphia, p1666-84
19. Childs R, Sanchez C, Engler H, et al (1998) High incidence of adeno- and polyomavirus-induced hemorrhagic cystitis in bone marrow allotransplantation for hematological malignancy following T cell depletion and cyclosporine. *Bone Marrow Transplant* 22: 889-93
20. Chmielewicz B, Nitsche A, Schweiger B, et al (2005) Development of a PCR-based assay for detection, quantification, and genotyping of human adenoviruses. *Clinical Chemistry* 51: 1365-73
21. Cooper LJN (2008) Adoptive cellular immunotherapy for childhood malignancies: *Bone Marrow Transplant* 41: 183-92

22. Dalapathy S, Lily T, Roy S, et al (1998) Development and use of nested polymerase chain reaction (PCR) for the detection of adenovirus from conjunctivitis specimens. *J Clin Virol* 11: 77-84
23. Dang Y, Knutson KL, Goodell V, et al (2007) Tumor antigen-specific T-cell expansion is greatly facilitated by in vivo priming. *Clin Cancer Res* 13: 1883-91
24. De Jong J, Wermenbol A, Verwij-Uijterwaal MW, et al (1999) Adenovirus from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J Clin Microbiol* 37: 3940-5.
25. Demeure CE, Byun DG, Yang LP et al (1996) CD31 (PECAM-1) is a differentiation antigen lost during human CD4 T-cell maturation into Th1 or Th2 effector cells. *Immunol* 88: 110-5
26. Dominguez O, Rojo P, de Las Heras S, et al (2005) Clinical presentation and characteristics of pharyngeal adenovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 24: 733-4
27. Douek DC, McFarland RD, Keiser PG, et al (1998) Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 396: 690-5
28. Douek DC, Vescio RA, Betts MR, et al (2000) Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet* 355: 1875-81
29. Ebell W (2006) Hämatopoetische Stammzelltransplantation. In: Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J (Hrsg). Springer, Heidelberg, S 66-85
30. Echavarria M (2008) Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clin Microbiol Rev* 21: 704-15
31. Einsele H, Roosnek E, Rufer N G, et al (2002) Infusion of cytomegalovirus (CMV) - specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 99: 3916-22
32. Eyrich M, Croner T, Leiler C, et al (2002) Distinct contributions of CD4+ and CD8+ naïve and memory T-cells subsets to overall TCR-repertoire complexity following

- transplantation of T-cell depleted CD34-selected hematopoietic progenitor cells from unrelated donors. *Blood* 100: 1915-18
33. Eyrich M, Lang P, Lal S, et al (2001) A prospective analysis of the pattern of immune reconstitution following transplantation of HLA-separate hematopoietic stem cells from parental donors. *Br J Haematol* 114: 422-32
 34. Eyrich M, Leiler C, Lang P, et al (2003) A prospective comparison of immune reconstitution in pediatric recipients of positively selected CD34(+) peripheral blood stem cells from unrelated donors vs. recipients of unmanipulated bone marrow from related donors. *Bone Marrow Transplant* 32: 379-90
 35. Feuchtinger T, Lang P, Hamprecht K, et al (2004) Isolation and expansion of human adenovirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells according to IFN-gamma secretion for adjuvant immunotherapy. *Exp Hematol* 32: 282-9
 36. Feuchtinger T, Lücke J, Hamprecht K, et al (2005) Detection of adenovirus specific T-cells in children with adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 128: 503-9
 37. Feuchtinger T, Richard C, Joachim S, et al (2008) Clinical grade generation of hexon-specific T cells for adoptive T-cell transfer as a treatment of adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *J Immunol* 31: 199-206
 38. Flomenberg P, Babbitt J, Drobyski WR, et al (1994) Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis* 169: 774-81
 39. Flomenberg P, Piaskowski V, Truitt RL, et al (1995) Characterization of human proliferation T cell responses to adenovirus. *J Infect Dis* 171: 1090-6
 40. Foster AE, Forrester K, Gottlieb DJ, et al (2004) Large-Scale expansion of cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells in suspension culture. *Biotechnol* 85: 138-46
 41. Fry TJ, Moniuszko M, Greekmore S, et al (2003) IL-7 therapy dramatically alters peripheral T-cell homeostasis in normal and SIV-infected nonhuman primates. *Blood* 101: 2294-9
 42. Gavin PJ, Katz BZ (2002) Intravenous ribavirin treatment for severe adenovirus disease in immunocompromised children. *Pediatrics* 110: 1-8

43. Gudmundsdottir H, Turka LA (2001) A closer look at homeostatic proliferation of CD4⁺ T-cells costimulatory requirements and role in memory formation. *J Immunol* 167: 3699-707
44. Hale GA, Heslop HE, Krance RA, et al (1999) Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 23: 277-82
45. Hammer MH, Meyer S, Brestrich G, et al (2005) HLA-type-independent generation of antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *Eur J Immunol* 35: 2250-8
46. Handgretinger R, Peters C, Schuster FR, et al (2006) Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *J Haematol* 134: 64-74
47. Hazenberg MD, Borghans JA, de Boer RJ, et al (2003) Thymic output: a bad TREC record. *Nat Immunol* 4: 97-9
48. Hazenberg MD, Otto SA, de Pauw ES, et al (2002) T-cell receptor excision circle and T-cell dynamics after allogeneic stem cell transplantation are related to clinical events. *Blood* 99: 3449-53
49. Heitger A, Neu N, Kern H, et al (1997) Essential role of the thymus to reconstitute naïve (CD45 RA⁺) T-helper cells after human allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 90: 850-7
50. Heslop HE, Ng CY, Li C, et al (1996) Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat Med* 2: 551-5
51. Hierholzer JC (1992) Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin Microbiol Rev* 5: 262-74
52. Hierholzer JC, Halonen PE, Dahlen PO, et al (1993) Detection of adenovirus in clinical specimens by polymerase chain reaction and liquid-phase hybridization quantitated by time resolved fluorometry. *J Clin Microbiol* 31: 1886-91
53. Hilleman MR, Werner JH (1954) Recovery of a new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med* 85: 183-8

54. Hoffman JA, Shah AJ, Ross LA, et al (2001) Adenoviral infections and a prospective trial of cidofovir in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 7: 388-94
55. Howard D, Phillips G, Reece D, et al (1999) Adenovirus infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 29: 1494-501
56. Kimmig S, Przybylski GK, Schmidt CA, et al (2002) Two subsets of naïve T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *J Exp Med* 195: 789-94
57. Ko G, Cromeans T, Sobsey M (2003) Detection of infectious adenovirus in cell culture by mRNA reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* 69: 7377-84
58. Kojaoghlanian T, Flomenberg P, Horwitz MS (2003) The impact of adenovirus infections on the immunocompromised host. *Rev Med Virol* 13: 155-71
59. Kong F, Chen CH, Cooper MD (1998) Thymic function can be accurately monitored by the level of recent T cell emigrants in the circulation. *Immunity* 8: 97-104
60. Lang P, Handgretinger R (2008) Haploidentical SCT in children: an update and future perspectives. *Bone Marrow Transplant* 42: 54-9
61. Lankester AC, Heemskerk B, Claas EC, et al (2004) Effect of ribavirin on the plasma viral DNA load in patients with disseminating adenovirus infection. *Clin Infect Dis* 38: 1521-5
62. La Rosa AM, Champlain RE, Mirza M, et al (2001) Adenovirus infections in adult recipients of blood and marrow transplants. *Clin Infect Dis* 32: 871-6
63. Leen AM, Myers GD, Sili U, et al (2006) Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat Med* 12: 1160-6
64. Legrand F, Berrebi D, Houhou N, et al (2001) Early diagnosis of adenovirus infection and treatment with cidofovir after bone marrow transplantation in children. *Bone Marrow Transplant* 27: 621-6
65. Leruez-Ville M, Minard V, Lacaille F, et al (2004) Real-time blood plasma polymerase chain reaction for management of disseminated adenovirus infection. *Clin Infect Dis* 38: 45-52

66. Lewin SR, Heller G, Zhang L, et al (2002) Direct evidence for new T cell generation by patients after either T cell-depleted or unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Blood* 100: 2235-42
67. Liles WC, Cushing H, Holt S, et al (1993) Severe adenoviral nephritis following bone marrow transplantation: successful treatment with intravenous ribavirin. *Bone Marrow Transplant* 12: 409-12
68. Lim LC, Fiordalisi MN, Mantell JL, et al (1998) A whole-blood assay for qualitative and semiquantitative measurements of CD69 surface expression on CD4 and CD8 T lymphocytes using flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol* 5: 392-8
69. Lion T, Baumgartinger R, Watzinger F, et al (2003) Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease. *Blood* 102: 1114-20
70. Livak F, Schatz D (1996) T-cell receptor alpha locus V (D) J recombination by-products are abundant in thymocytes and mature T cells. *Mol Cell Biol* 16: 609-18
71. Ljungman P, Gleaves CA, Meyers JD (1989) Respiratory virus infections in immunocompromised patients. *Bone Marrow Transplant* 4: 35-40
72. Ljungman P, Ribaud P, Eyrich M, et al (2003) Cidofovir for adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a survey by the infectious diseases working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 31: 481-6
73. Mackall CL, Ganger L, Sheard MA, et al (1993) T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45-isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny. *Blood* 82: 2585-94
74. Mackall CL, Gress RE (1997) Pathways of T-cell regeneration in mice and humans: implications for bone marrow transplantation and immunotherapy. *Immunol Rev* 157: 61-72
75. Mackinnon S, Thomson K, Verfuerrth S, et al (2008) Adoptive cellular therapy for cytomegalovirus infection following allogeneic stem cell transplantation using virus-specific T cells. *Blood Cells Mol Dis* 40: 63-7

76. Matsuse T, Matsui H, Shu CY, et al (1994) Adenovirus pulmonary infections identified by PCR and in situ hybridization in bone marrow transplant recipients. *J Clin Pathol* 47: 973-7
77. Min D, Taylor PA, Panoskaltsis-Matar, et al (2002) Protection from thymic epithelial cell injury by keratinocyte growth factor: a new approach to improve thymic and peripheral T-cell reconstitution after bone marrow transplantation. *Blood* 99: 4592-600
78. Miyamura K, Hamaguchi M, Taji H, et al (2000) Successful ribavirin therapy for severe adenovirus hemorrhagic cystitis after allogeneic marrow transplant from close HLA donors rather than distant donors. *Bone Marrow Transplant* 25: 545-8
79. Murphy GF, Wood DP JR, McRoberts JW, et al (1993) Adenovirus-associated hemorrhagic cystitis treated with intravenous ribavirin. *J Urol* 149: 565-6
80. Myers GD, Bollard CM, Wu M-F, et al (2007) Reconstitution of adenovirus-specific cell-mediated immunity in pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 39: 677-86
81. Niemann TH, Trigg ME, Winick N, et al (1993) Disseminated adenoviral infection presenting as acute pancreatitis. *Hum Pathol* 24: 1145-8
82. Olkinuora H, Talvensaaari K, Kaartinen T, et al (2007) T cell regeneration in pediatric allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 39: 149-56
83. Olkinuora HA, Taskinen MH, Saarinen-Pihkala UM, et al (2009) Multiple viral infections post-hematopoietic stem cell transplantation are linked to the appearance of chronic GVHD among pediatric recipients of allogeneic grafts. *Pediatr Transplantation*, DOI: 10.1111/j.1399-3046.2009.01226.x
84. Pham TT, Burchette JL JR, Hale LP (2003) Fatal disseminated adenovirus infections in immunocompromised patients. *J Clin Pathol* 120: 575-83
85. Picker L, Singh M, Zdraveski Z, et al (1995) Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T-cells by flow cytometry. *Blood* 86: 1408-19
86. Prince HE, Lapé-Nixon M (1997) CD69 expression reliably predicts the anti-CD3-induced proliferative response of lymphocytes from human immunodeficiency virus Type 1-infected patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 4: 217-22

87. Raboni SM, Siqueira MM, Portes SR, Pasquini R (2003) Comparison of PCR, enzyme immunoassay and conventional culture for adenovirus detection in bone marrow transplant patients with hemorrhagic cystitis. *J Clin Virol* 27: 270-5
88. Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, et al (1992) Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 257: 238-41
89. Runde V, Ross S, Trenchel R, et al (2001) Adenoviral infection after allogeneic stem cell transplant (SCT): report on 130 patients from a single SCT unit involved in a prospective multi center surveillance study. *Bone Marrow Transplant* 28: 51-7
90. Russell WC (2000) Update on Adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* 81: 2573-604
91. Rutella S, Rumi C, Lucia MB, et al (1999) Induction of CD69 antigen on normal CD4+ and CD8+ lymphocyte subsets and its relationship with the phenotype of responding T-cells. *Cytometry* 38: 95-101
92. Schwinger W, Weber-Mzell D, Zois B, et al (2006) Immune reconstitution after purified autologous and allogeneic blood stem cell transplantation compared with unmanipulated bone marrow transplantation in children. *Br J Haematol* 135: 76-84
93. Seidemann K, Heim A, Pfister ED, et al (2005) Monitoring of adenovirus infection in pediatric transplant recipients by quantitative PCR: report of six cases and review of the literature. *Am J Transplant* 4: 2102-8
94. Sencer SF, Haake RJ, Weisdorf DJ (1993) Hemorrhagic cystitis after bone marrow transplantation. Risk factors and complications. *Transplantation* 56: 875-9
95. Sester M, Sester U, Alarcon Salvador S, et al (2002) Age-related decrease in adenovirus-specific T cell response. *J Infect Dis* 185: 1379-87
96. Shayan K, Saunders F, Roberts E, Cutz E (2003). Adenovirus enterocolitis in pediatric patients following bone marrow transplantation: report of 2 cases and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 127: 1615-8
97. Shields AF, Hackman RC, Fife KH, et al (1985). Adenovirus infections in patients undergoing bone marrow transplantation. *Engl J Med* 312: 529-33
98. Simms PE, Ellis TM (1996) Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly-and oligoclonal lymphocyte activation. *Clin Diagn Lab Immunol* 3: 301-4

99. Storek J, Dawson MA, Storer B, et al (2001) Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood* 97: 3380-9
100. Takeshita S, Toda M, Yamagishi H (1989) Excision products of the T-cell receptor gene support a progressive rearrangement model of the alpha/ delta locus. *EMBO J* 8: 3261-70
101. Van Tol MJ, Class EC, Heemskerk B, et al (2005) Adenovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation: diagnosis, treatment and immunity. *Bone Marrow Transplant* 35 (Suppl 1): 73-6
102. Van Tol MJ, Kroes AC, Schinkel J, et al (2005) Adenovirus infection in pediatric stem cell transplant recipients: increased risk in young children with delayed immune recovery. *Bone Marrow Transplant* 36: 39-50
103. Venard V, Carret AS, Corsaro D, et al (2000) Genotyping of adenovirus isolated in an outbreak in a bone marrow transplant unit shows that diverse strains are involved. *J Hosp Infect* 44: 71-4
104. Waldrop SL, Pitcher C, Peterson D, et al (1997) Determination of antigen-specific memory/ effector CD4⁺ T cell frequencies by flow cytometry. *J Clin Invest* 99: 1739-50
105. Walls T, Hawrami K, Ushiro-Lumb I, et al (2005) Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation: is treatment always necessary? *Clin Infect Dis* 40: 1244-9
106. Walls T, Shankar AG, Shingadia D (2003) Adenovirus: an increasingly important pathogen in paediatric bone marrow transplant patients. *Lancet Infect Dis* 3: 79-86
107. Watanabe M, Kohdera U, Kino M, et al (2005) Detection of adenovirus DNA in clinical samples by SYBR green real-time polymerase chain reaction assay. *Pediatr Int* 47: 286-91
108. Weinberg K, Blazar BR, Wagner JE, et al (2001) Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 168: 4968-79

11 Danksagung

Ich danke der Bundesrepublik Deutschland und der Charité, Universitätsmedizin Berlin, für das Arbeits- und Promotionsangebot und meinem Heimatland Libyen für die finanzielle Unterstützung durch ein Stipendium.

Herrn Prof. Dr. med. G. Gaedicke, Direktor der Klinik für Allgemeine Pädiatrie am Campus Virchow-Klinikum der Charité, danke ich für die Überlassung des Themas.

Dem Labor für Zelluläre Therapie der Kinderklinik der Charité danke ich für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten durchzuführen, Frau Dr. O. Arbach, Frau Dr. S. Gaubert und Frau Roßa für die breite Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Laborarbeiten und Frau Dr. G. Strauß, Herrn Dr. J. Kühl und dem Pflegepersonal der pädiatrischen KMT-Station der Charité für die Gewinnung der Patientenproben und Übermittlung der klinischen Daten.

Herrn Dr. W. Ebell danke ich als leitendem Oberarzt der Pädiatrischen Knochenmarktransplantation an der Charite und Laborleiter des Labors für Zelluläre Therapie für die Laborunterstützung und die Hilfestellung bei der klinischen Interpretation der Daten sowie der deutschsprachigen Formulierung der Dissertation.

Und schließlich danke ich meiner Freundin Antje Draeger für ihre Hilfe und Unterstützung während meiner Anwesenheit in Berlin.

12 Curriculum vitae

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

13 Erklärung

„Ich, Eida El-Mansorry, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Regeneration Adenovirus-spezifischer T-Zellen nach allogener, hämatopoetischer Stammzelltransplantation bei Kindern und Jugendlichen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

14.07.2010

Eida El-Mansorry

Datum

Unterschrift