

Aus dem Deutschen Herzzentrum Berlin  
Klinik für angeborene Herzfehler und Kinderkardiologie

DISSERTATION

**Einfluss Immunsuppressiver Medikation auf die Epstein-Barr  
Viruslast bei Kindern nach Herztransplantation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christiane Renner

aus Altdöbern

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Abdul-Khaliq  
2. Prof. Dr. med. S. Ensminger  
3. Priv.-Doz. Dr. med. R. U. Trappe

**Datum der Promotion: 18.09.2009**

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung .....	6
1.1.	Entwicklung der Transplantation .....	6
1.2.	Überleben nach Transplantation.....	6
1.3.	Posttransplant-Lymphoproliferative-Disease (PTLD).....	8
1.3.1.	Histologische Klassifikation der PTLD .....	9
1.3.2.	Zeitpunkt der Entstehung und Lokalisation der PTLD .....	9
1.3.3.	PTLD-EBV assoziiert .....	10
1.3.4.	PTLD-Nicht EBV assoziiert.....	12
1.4.	Epstein-Barr Virus (EBV).....	13
1.4.1.	Entdeckung und Erstbeschreibung des Epstein-Barr Virus .....	13
1.4.2.	Epidemiologie des Epstein-Barr Virus.....	13
1.4.3.	Klinische Präsentation einer Epstein-Barr Virusinfektion .....	14
1.4.4.	Immunantwort in Immunkompetenten.....	14
1.4.4.1.	Latenz .....	15
1.4.4.2.	Übergang von der Latenten in die Lytische Phase.....	17
1.4.4.3.	EBV Infektionen in immunsupprimierten Patienten.....	17
1.5.	Aufgabenstellung .....	19
2.	Methoden und Materialien .....	20
2.1.	Studienpopulation.....	20
2.2.	Medikamentöse Therapie nach Herztransplantation .....	20
2.3.	Mindestdauer der Verabreichung der Immunsuppressiva.....	21
2.4.	DNA Isolierung aus Vollblut für die quantitative PCR .....	21
2.5.	Real-Time PCR Messung der EBV Last aus dem Vollblut .....	22
2.6.	Datenmanagement und Statistik.....	22
3.	Ergebnisse .....	24
3.1.	Umschreibung der Population.....	24
3.2.	Indikationen für die Herztransplantation.....	24
3.3.	EBV Status vor der Transplantation.....	24
3.4.	CMV Status vor und nach Transplantation .....	25
3.5.	Induktion .....	25
3.6.	Einstiegsimmunsuppression .....	25
3.7.	EBV Infektion .....	26
3.8.	Faktoren welche die EBV Last beeinflussen.....	26

3.8.1.	Einfluss des Alters der Patienten auf die EBV Last.....	27
3.8.2.	Einfluss der Polyklonalen Antithymozyten Antikörper (ATG) und Interleukin (IL)-2-Rezeptor-Antikörper .....	27
3.8.3.	Einfluss des Calcineurininhibitors auf die EBV Last (Cyclosporin A vs. Tacrolimus) .....	28
3.8.4.	Einfluss der Caclineurininhibitorspiegel auf die EBV Last.....	29
3.8.5.	Einfluss der immunsuppressiven Kombinationen.....	32
3.8.5.1.	Cyclosporin A (Sandimmun®) & Azathioprin (Imurek®).....	34
3.8.5.2.	Cyclosporin A (Sandimmun®) & Mycophenolat Mofetil (Cell Cept®) .	35
3.8.5.3.	Cyclosporin A (Sandimmun®) & Everolimus (Certican®).....	36
3.8.6.	Direkter Vergleich der immunsuppressiven Kombinationen.....	37
3.8.7.	Einfluss der Virustatika auf die EBV Last.....	38
3.8.8.	Inzidenz von Abstoßungen.....	39
3.8.8.1.	Abstoßungen im ersten Jahr nach Herztransplantation .....	39
3.8.8.2.	Abstoßungen nach einem Jahr nach Transplantation.....	39
3.8.8.3.	Einfluss von Abstoßungen auf die EBV Last.....	40
3.9.	Multivariatanalyse der Einflussfaktoren auf die EBV Last .....	41
3.10.	Posttransplant-Lymphoproliferative Disease (PTLD) .....	42
3.11.	Evaluierung des Tests der EBV Last Bestimmung bezüglich der PTLD .....	44
3.12.	Einfluss medikamentöser Interventionen auf die EBV Last .....	44
4.	Diskussion.....	48
4.1.	Wertigkeit der EBV Last Bestimmung nach Herztransplantation .....	48
4.2.	Methodik und Materialien zur Bestimmung der Epstein-Barr Viruslast .....	49
4.3.	Evaluation verschiedener Grenzwerte der Epstein-Barr Viruslasten.....	49
4.4.	PTLD.....	50
4.5.	Faktoren die zu einer erhöhten EBV Last führen.....	51
4.5.1.	Alter , EBV Status bei Transplantation und EBV Mismatch .....	51
4.5.2.	Polyklonale Antithymozyten Antikörper .....	51
4.5.3.	Calcineurininhibitoren im Vergleich.....	52
4.5.4.	Ergänzende Immunsuppressiva.....	53
4.5.5.	Cytomegalie Virus Mismatch und Infektion .....	55
4.5.6.	Abstoßungen und deren Behandlung .....	55
4.6.	Limitationen .....	56
4.7.	Schlussfolgerung .....	57

4.8. Ausblick .....	58
5. Zusammenfassung .....	59
6. Abstract .....	61
7. Tabellenverzeichnis.....	62
8. Abbildungsverzeichnis .....	63
9. Abkürzungsverzeichnis .....	64
10. Literaturverzeichnis.....	65
Lebenslauf .....	74
Publikationsliste .....	75
Danksagung.....	76
Erklärung.....	77

## **1. Einleitung**

### **1.1. Entwicklung der Transplantation**

1967 wurde durch Christiaan Barnard in Kapstadt zum ersten Mal eine orthotope Herztransplantation vorgenommen. In den folgenden drei Jahren wurden weltweit ca. 153 weitere Herztransplantationen durchgeführt. Bis 1970 lebten jedoch nur noch 14% dieser Patienten und lediglich 20% aller Herztransplantierten hatten bis dahin länger als ein Jahr überlebt. Die Patienten verstarben meist an akuten Abstoßungen. Mit der Entdeckung des Cyclosporin A im Jahre 1976 und der Zulassung zur Behandlung transplantierte Patienten 1982 wurden die Erfolgsraten der Transplantation und die Überlebenszeiten der Patienten schnell gebessert. So betrug die 1-Jahres-Überlebensrate für Herztransplantierte Patienten 1985 bereits 76%.

1984 wurde, unter Leitung des Chirurgen Professor Leonard Bailey, an der Loma Linda Universität in Kalifornien, einem Neugeborenen ein Pavianherz verpflanzt, da kein menschliches Herz zur Verfügung stand. Der Säugling verstarb nach 20 Tagen an einer akuten Abstoßung. Trotz allem wurde das Loma Linda Team in seinen Anstrengungen ermutigt. Im November 1985 führte Professor Bailey dann die erste Transplantation an einem Neugeborenen durch, bei der das Kind das Herz eines hirntoten Säuglings erhielt und überlebte [1]. Der Erfolg des Loma Linda University Medical Centers, ermutigte Zentren in der ganzen Welt Herztransplantationen bei Neugeborenen und Kindern durchzuführen. Zum heutigen Zeitpunkt werden weltweit jährlich 360 Herztransplantationen an Kindern durchgeführt [2].

### **1.2. Überleben nach Transplantation**

Die orthotope Herztransplantation (HTx) von Erwachsenen und Kindern ist zu einer etablierten Art der Behandlung der Herzinsuffizienz im Endstadium geworden. In den letzten Jahren gibt es eine anhaltende Tendenz der Abnahme von früher Mortalität nach HTx. In der Statistik der International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) sieht man jedoch den über 20 Jahre Follow up anhaltenden Abfall der Langzeitüberlebensraten nach Herztransplantation bei Kindern (siehe Abbildung 1). Zwar lässt sich eine allmähliche Verbesserung des Langzeitüberlebens in Abhängigkeit von der Transplantationsepoche nachweisen, jedoch ist diese primär das Resultat der verbesserten frühen posttransplant Überlebensraten durch sehr gutes postoperatives Management [2].

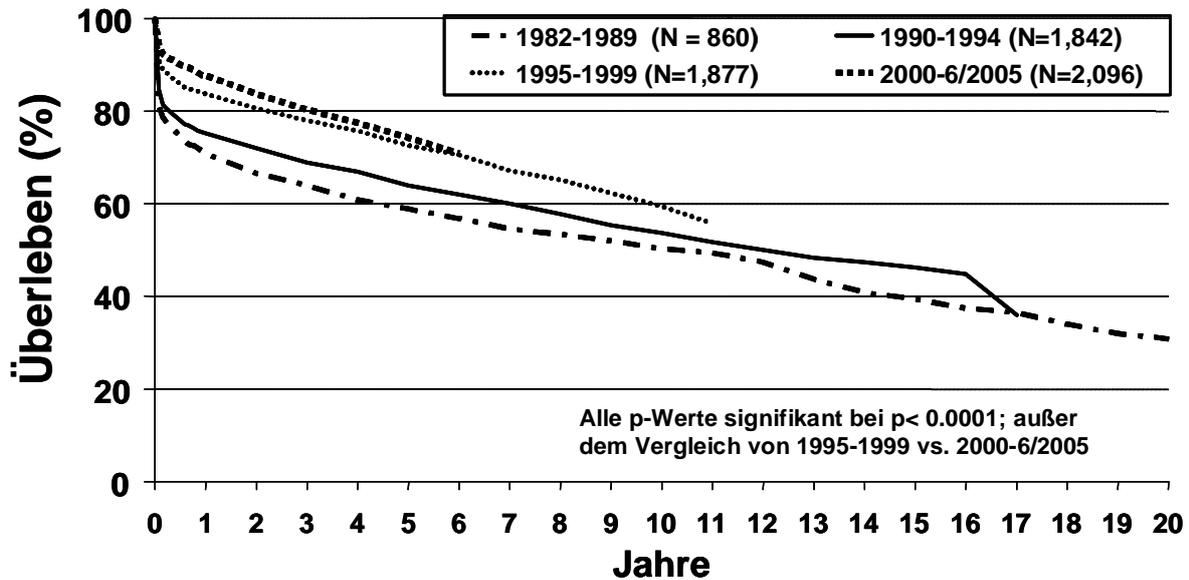


Abbildung 1: Überleben für pädiatrische Patienten nach Herztransplantation dargestellt in Abhängigkeit von der Transplantationsepoche. Reproduziert von der Internationalen Gesellschaft für Herz- und Lungentransplantation (ISHLT) ([www.isHLT.org](http://www.isHLT.org)) [2]

Die aktuelle Todesursachenstatistik der ISHLT für Kinder nach Herztransplantation zeigt Tabelle 1. Der Grund für die frühe Mortalität ist primär das Transplantatversagen. In der Zeit von 31 Tagen bis zu einem Jahr dominiert dann die akute Abstoßung als Haupttodesursache. Zwischen einem Jahr und drei Jahren überwiegen akute Abstoßung und Transplantatversagen, während die Inzidenz infektiöser Ursachen abnimmt. Nach dieser Zeit dominiert das Transplantatversagen aufgrund einer Transplantatvaskulopathie (TVP) als Haupttodesursache die Langzeitmortalität.

Lymphome nehmen als Todesursache im Verlauf immer mehr zu und stehen nach 5 Jahren mit 8,5 % der Fälle als Todesursache, nach TVP, akuter Abstoßung und Transplantatversagen, an vierter Stelle.

**Tabelle 1: Todesursachenstatistik der ISHLT 2006 [2]**

Todesursache	0-30 Tage (N = 358)	31 Tage - 1 Jahr (N = 303)	>1 Jahr - 3 Jahre (N = 220)	>3 Jahre - 5 Jahre (N = 150)	>5 Jahre (N = 281)
Transplantat- vaskulopathie	4 (1.1%)	26 (8.6%)	42 (19.1%)	55 (36.7%)	79 (28.1%)
Akute Abstoßung	33 (9.2%)	80 (26.4%)	59 (26.8%)	19 (12.7%)	37 (13.2%)
<b>Lymphom</b>		<b>6 (2.0%)</b>	<b>10 (4.5%)</b>	<b>3 (2.0%)</b>	<b>24 (8.5%)</b>
Andere bösartige Tumoren		4 (1.3%)	2 (0.9%)	1 (0.7%)	10 (3.6%)
CMV Infektion	1 (0.3%)	7 (2.3%)	1 (0.5%)		
Infektion anderer Ursache	49 (13.7%)	49 (16.2%)	17 (7.7%)	7 (4.7%)	21 (7.5%)
Primäres Versagen	62 (17.3%)	12 (4.0%)	7 (3.2%)	8 (5.3%)	12 (4.3%)
Transplantatversagen	85 (23.7%)	35 (11.6%)	40 (18.2%)	34 (22.7%)	55 (19.6%)
Technisch	22 (6.1%)	2 (0.7%)	2 (0.9%)	1 (0.7%)	1 (0.4%)
Anderes	18 (5.0%)	17 (5.6%)	18 (8.2%)	12 (8.0%)	19 (6.8%)
Multipl. Organ Versagen	35 (9.8%)	36 (11.9%)	4 (1.8%)	3 (2.0%)	10 (3.6%)
Nierenversagen	1 (0.3%)	4 (1.3%)	1 (0.5%)		
Pulmonal	24 (6.7%)	18 (5.9%)	10 (4.5%)	6 (4.0%)	9 (3.2%)
Cerebrovaskulär	24 (6.7%)	7 (2.3%)	7 (3.2%)	1 (0.7%)	4 (1.4%)

### 1.3. Posttransplant-Lymphoproliferative-Disease (PTLD)

Die Entwicklung eines Lymphoms nach Transplantation wurde zum ersten Mal im Jahre 1968 von Doak et al. in einem Nierentransplantierten Patienten beschrieben [3]. Die Bezeichnung Posttransplant-Lymphoproliferative-Disease oder Disorder (PTLD) wurde von Starzl et al. 1984 eingeführt [4]. Die PTLD ist eine ernsthafte Komplikation nach Organtransplantation, die aus Nebenwirkungen der notwendigen Immunsuppression für ein erfolgreiches Erhalten des Transplantats entsteht und in erhöhter Morbidität und Mortalität resultiert [5, 6].

Die Inzidenz der PTLD variiert je nach transplantiertem Organ und somit auch mit der Intensität der Immunsuppression. Sie liegt bei 1-6% bei Patienten nach Leber- oder Nierentransplantation [7, 8] und bei 3-20% nach Herz- oder Lungentransplantation [9].

Die PTLD tritt häufig im Zusammenhang mit dem Epstein-Barr Virus auf. Es wird aber auch, vor allem im späteren Verlauf nach Transplantation, über das Auftreten EBV-negativer Fälle berichtet (siehe Abschnitt 1.3.4 PTLD-Nicht EBV assoziiert).

### 1.3.1. Histologische Klassifikation der PTLD

Die PTLD ist eine klinisch und histologisch heterogene Gruppe von monoklonalen oder reaktiv polyklonalen lymphoproliferativen Läsionen [10, 11]. Die meisten PTLDs entstammen der B-Zell Linie, aber auch T- oder Natürliche Killerzell (NK)-Lymphome, die bei einem transplantierten Patienten auftreten, werden als PTLD klassifiziert. Die World Health Organisation (WHO) unterscheidet momentan vier Kategorien der PTLD [12] (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Histologische Klassifikation der PTLD (WHO) [11]**

Hyperplastische PTLD „early lesions“	Reaktiv plasmatische Hyperplasie Infektiöse Mononukleose Atypische lymphoide Hyperplasie	
Polymorphe PTLD		
Lymphomatöse PTLD (monomorphe PTLD)	B-Zell Lymphom	Diffuses large B-Zell Lymphom Burkitt/Burkitt-like Lymphom Maltom
	T-Zell Lymphom	Peripheres T-Zell Lymphom Anaplastisches Large-Zell Lymphom (Z- oder Null-Zell) Hepatosplenic gamma-delta T-Zell Lymphom Andere (bspw. NK-Zell)
Andere	Plasmozytom Myelom Hodgkin-like B-Zell Lymphom	

### 1.3.2. Zeitpunkt der Entstehung und Lokalisation der PTLD

Die Posttransplant-Lymphoproliferative-Disease (PTLD) kann zu jedem Zeitpunkt nach der Transplantation entstehen. Das Risiko eine PTLD zu entwickeln ist im ersten Jahr nach Transplantation signifikant erhöht [13]. Dies ist bedingt durch die direkt nach Transplantation erhöhte Immunsuppression und durch den Gebrauch von Anti-T-Zell-Antikörpern zur Induktionstherapie oder Abstoßungsbehandlung. Bei herztransplantierten Patienten ist die Studienlage bezüglich des Zeitpunktes der Entstehung einer PTLD unterschiedlich: einige Studien konnten eine Dominanz früher PTLD Fälle nachweisen [14-17], obwohl andere eine gleichmäßigere Verteilung oder sogar vermehrt Fälle einer späten PTLD beobachteten [18-21].

Die PTLD kann sich auf eine Lokalisation beschränken, z.B. auf die Lymphknoten oder im transplantierten Organ selbst, dem Magen-Darm Trakt, der Leber, dem ZNS oder der Milz. Sie kann jedoch auch als disseminierte Erkrankung auftreten [14, 18].

Der Ort der Manifestation einer PTLD scheint mit dem Zeitpunkt der Entstehung assoziiert zu sein. Dass heißt in der Phase direkt nach der Transplantation tritt die PTLD häufig in dem transplantierten Organ auf. Beispielsweise tritt bei Lungentransplantation die PTLD im ersten Jahr nach Tx in über 50% der Fälle im Transplantat selbst auf, während nach einem Jahr dies kaum mehr der Fall ist [22, 23]. In der Studie von Wilde et al. [24] schienen herz- und lebertransplantierte Patienten die Ausnahme zu sein, was die Manifestation der PTLD im transplantierten Organ betrifft. Die Patienten präsentierten die PTLD ebenmäßig verteilt, in nahezu jeder anatomischen Region des Körpers.

Der pathophysiologische Mechanismus, der zu dieser bevorzugten Lokalisation im Transplantat führt ist jedoch noch nicht klar verstanden. Eine Theorie besagt, dass EBV-infizierte Donor-B-Zellen, welche mit dem Spenderorgan in den Körper des Empfängers gelangt sind, der immunologischen Kontrolle des Empfängers entgehen, und eine auf Zellen des Spenders basierende PTLD entsteht [25, 26]. Jedoch geht die Mehrzahl der PTLD-Fälle, welche früh nach der Transplantation entstehen, auf Zellen des Empfängers zurück [27, 28]. Zu vermuten ist, dass die kontinuierlich Stimulation des Immunsystems des Empfängers, ein Faktor in der Entstehung der PTLD darstellt.

### **1.3.3. PTLD-EBV assoziiert**

Das Epstein-Barr Virus wurde aufgrund seiner Präsenz in der Mehrzahl der Lymphoproliferativen Läsionen ursächlich mit der PTLD assoziiert [29, 30]. Unter Immunsuppression zeigten über 80% der Tumore Hinweise auf Reaktivierung des lytischen (early Antigene) Zyklus und 30-40% der Tumore enthielten EBV late-Antigene oder Replikations DNA [31, 32]. Fast alle Lymphoproliferativen Läsionen, die in der frühen Phase nach Transplantation entstehen, sind EBV positiv und (auf der Basis der Positivität für EBNA1 und LMP1) exprimieren das Latenz III Programm. Dieses identifiziert sie als Virus-transformierte B-Zellen, die in Abwesenheit effektiver T-Zell-Kontrolle wachsen können [33]. Die Unterdrückung des Immunsystems führt vorrangig zu einer verminderten Funktion Epstein-Barr Virus (EBV) spezifischer T-Zellen, die eine unkontrollierte Proliferation EBV infizierter B-Zellen ermöglicht.

Eine spezielle Kategorie von Patienten, die einem besonders hohen Risiko ausgesetzt sind eine PTLD zu entwickeln (10- bis 50fach erhöht), sind EBV-seronegative Empfänger, die das Organ eines EBV-seropositiven Spenders erhalten, was folglich zur Primärinfektion nach Transplantation und somit unter Immunsuppression führt [19, 34, 35]. Das ist auch der Grund

warum pädiatrische Patienten im Vergleich zu Erwachsenen ein erhöhtes Risiko haben, nach Organtransplantation eine PTLD zu entwickeln. Sie hatten mit höherer Wahrscheinlichkeit zum Zeitpunkt der Transplantation noch keinen Kontakt mit dem Virus gehabt [5]. Aufgrund dieses markant erhöhten Risikos für die Entwicklung einer PTLD wurde eine vor Transplantation stattfindende Immunisierung EBV-seronegativer Patienten vorgeschlagen. Allerdings wird an einem Impfstoff gegen EBV noch geforscht und so ist dieser vorerst nicht kommerziell erhältlich [36, 37].

Ein wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung einer PTLD ist die Intensität der Immunsuppression, die dem Patienten verabreicht wird. In diesem Zusammenhang führt die Induktion [38] und die Abstoßungsbehandlung mit Antithymozyten-Antikörpern (ATG) und OKT3 möglicherweise zu einem erhöhten Risiko der Entwicklung einer PTLD [16, 39-42]. Die Induktionstherapie mit (IL)2-Rezeptor Antikörpern scheint bisher noch keine erhöhte Inzidenz der PTLD zu zeigen [41]. Es gibt jedoch bislang noch keine schlüssigen Beweise, dass die PTLD mit einem bestimmten Immunsuppressivum assoziiert ist [43-45].

Die Regression EBV-positiver B-Zell Tumore nach Verminderung der immunsuppressiven Medikation in transplantierten Patienten weist eindeutig auf die Rolle von T-Zellen bei der Kontrolle und Prävention der PTLD hin. T-Zellen stellen den Hauptangriffspunkt für Calcineurininhibitoren dar, um Abstoßungen nach Transplantation zu verhindern. Jedoch steigern Cyclosporin A und Tacrolimus die Expression von EBV Wachstums- und Virus-induzierenden Faktoren, wie IL10, IL6 und TGF $\beta$  und können den Lytischen Zyklus des Epstein-Barr Virus induzieren. Auch erhöhten sie die Resistenz gegenüber Immunzell-induzierter Apoptose durch Induktion von Anti-apoptotischen Genen [46, 47].

Die Intensität der Immunsuppression, wiedergegeben durch die Höhe der Spiegel im Blut, könnte eine Rolle in der Entwicklung der PTLD spielen. Jedoch gibt es bisher nur wenige Studien, die belegen, dass die Viruslast, bei Verminderung der Immunsuppression sinkt, und somit auch das Risiko der Entwicklung EBV assoziierter Lymphome. Orii et al. wiesen eine eindeutige Korrelation zwischen dem Blutspiegel von Tacrolimus und der EBV DNA im Vollblut nach [48]. Leider fehlen Studien, die eine Korrelation zwischen CyA Spiegeln im Blut und der EBV Last nachweisen.

Neben der Immunsuppression gibt es weitere Hauptrisikofaktoren für EBV assoziierte PTLDs. Dies sind ein EBV Mismatch (Empfänger negativ und Spender positiv), was besonders häufig in der pädiatrischen Patientengruppe auftritt, das Alter bei der Transplantation (je jünger die Patienten, desto höher das Risiko), frühe Serokonversion nach

Tx und Primärinfektion oder Reaktivierung nach Herztransplantation in Folge hoher Immunsuppression [20, 49-51].

Ob Cytomegalie Virus (CMV) Infektionen mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung einer PTLD einhergehen, ist in der Literatur kontrovers diskutiert worden. CMV Missmatch (Spender positiv und Empfänger negativ) und CMV Infektion nach der Transplantation (besonders bei CMV-seronegativen Empfängern), wurden jeweils mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung einer PTLD assoziiert [52-54]. Allerdings konnte dies in neueren Studien nicht belegt werden [35, 41, 55, 56]. Obwohl man nicht ausschließen kann, dass CMV eine Rolle in der PTLD Entwicklung spielt, scheint es zumindest, dass CMV Missmatch oder Infektion nach Tx keine Hauptrisikofaktoren für die Entstehung einer PTLD darstellen.

Die Analyse der Viruslast im Blut ist ein wichtiges diagnostisches Instrument, um den Verlauf von EBV Infektionen zu beobachten und so Patienten zu erkennen, die ein hohes Risiko zur Entwicklung einer PTLD haben [57, 58]. Die Messung der Epstein-Barr Virus DNA im Vollblut reflektiert die Replikation von EBV in immungeschwächten, transplantierten Patienten besser, weil bei ihnen parallel durchgeführte serologische Analysen auch negativ ausfallen können [57, 58]. Ein rapider Anstieg der EBV Last im Blut transplantierten Patienten ist ein signifikanter Risikofaktor für die Entwicklung einer PTLD [59, 60]. Patienten, die erst nach Transplantation primär infiziert werden, fallen mit hohen, teils persistierenden, Viruslasten auf. Aber auch solche, die schon vor Transplantation seropositiv waren und nun eine Reaktivierung durchlaufen, können hohe Viruslasten haben. Beide Gruppen haben ein erhöhtes Risiko eine PTLD zu entwickeln [61, 62].

#### **1.3.4. PTLD-Nicht EBV assoziiert**

PTLDs sind oft, aber nicht immer mit dem Epstein-Barr Virus assoziiert [63-65]. Die Inzidenz der EBV-negativen PTLDs variiert mit 0-50% je nach Autor beziehungsweise Publikation stark, wobei die Kriterien, die zur Diagnose einer PTLD führten unklar waren und auch die Methode zur Identifikation des Epstein-Barr Virus im Lymphom variierte mit der Möglichkeit falsch positiver oder negativer Befunde [63, 66, 67]. EBV-negative PTLDs treten für gewöhnlich später nach Transplantation auf als die EBV-positiven Fälle (im Median 50 vs. 10 Monate post Tx) [15, 68]. Die Morphologie EBV-negativer PTLDs zeigt ein weites Spektrum, jedoch haben sie im Vergleich zu EBV-positiven Fällen einen signifikant erhöhten Anteil an Monomorphen Dignitäten [68].

Es ist umstritten, ob EBV-negative Fälle eine eigene Subgruppe der PTLD präsentieren, oder ob sie eventuell konventionelle, sporadisch auftretende, maligne Lymphome darstellen.

Das klinische Outcome der meisten EBV-negativen Fälle monomorpher Histologie, ist selbst nach aggressiver Chemotherapie, als schlecht einzustufen [68]. Ob EBV Assoziation einen unabhängigen prognostischen Faktor darstellt, kann bei momentaner Studienlage jedoch nicht nachgewiesen werden.

## **1.4. Epstein-Barr Virus (EBV)**

### **1.4.1. Entdeckung und Erstbeschreibung des Epstein-Barr Virus**

Ein häufig bei Kindern und Jugendlichen in Ost- und Zentralafrika auftretendes Lymphom wurde 1958 erstmals von dem Chirurgen Dennis Burkitt beschrieben. Er fand heraus, dass dieser Tumor ungewöhnlich häufig in Äquatorial Afrika vorkam [69].

Burkitt sandte Biopsieproben der Tumore nach London an Anthony Epstein, welcher, zusammen mit seiner Doktorandin Yvonne Barr und Bert Achong, erfolgreich die Zellen dieser Lymphome in Kultur anzüchtete. Als sie diese unter dem Elektronenmikroskop untersuchten, fanden sie in einigen B-Zellen klare Hinweise auf die Anwesenheit von Herpesvirusähnlichen Partikeln [70]. Die entdeckten Fragmente unterschieden sich biologisch von anderen Mitgliedern der Familie der Humanen Herpesviren. Der Erreger wurde von Gertrude und Werner Henle als neue Virusgattung erkannt und nach seinen Entdeckern als Epstein-Barr Virus bezeichnet. Die Henles wiesen Antikörper gegen EBV im Blut von Patienten mit Burkitt Lymphom nach und konnten zeigen, dass diese Antikörper mit Antigenen im Tumor reagierten [71]. So wurde EBV als erstes humanes, onkogenes Virus identifiziert.

### **1.4.2. Epidemiologie des Epstein-Barr Virus**

Das Epstein-Barr Virus ist weltweit verbreitet. Seroepidemiologische Studien in den Entwicklungsländern zeigen, dass sich die meisten Kinder dort innerhalb der ersten drei Lebensjahre infizieren. Während der ersten Dekade beträgt die Durchseuchungsrate dann nahezu 100%.

Im Kontrast dazu steht die industrialisierte Welt. Als Folge der Veränderung des Lebensstils, sind circa 40% der Kinder bis zum zehnten Lebensjahr noch immer Seronegativ. Die

Durchseuchung steigt dann in der Pubertät auf Werte von über 90% an. Die Primärinfektion erfolgt bei engem Kontakt durch Speichel („Kissing Disease“). Ungefähr 5% der Erwachsenen bleiben negativ für EBV.

### **1.4.3. Klinische Präsentation einer Epstein-Barr Virusinfektion**

Die Primärinfektion findet meist in den ersten Lebensjahren statt [72] und verläuft dann oft asymptomatisch [73]. Findet die Infektion jedoch in der Adoleszenz oder später statt, wird das Bild der Infektiösen Mononukleose häufiger beobachtet [74]. Sie geht einher mit Fieber, Pharyngitis und Tonsillitis mit gräulichen Belägen, generalisierter oder zervikookzipital betonter Lymphadenopathie, Exanthem, Hepatitis und Splenomegalie. Das Fieber dauert etwa sieben bis zehn Tage an. Eine Restsymptomatik (subfebrile Temperaturen und Müdigkeit) kann noch über Monate bestehen [75].

### **1.4.4. Immunantwort in Immunkompetenten**

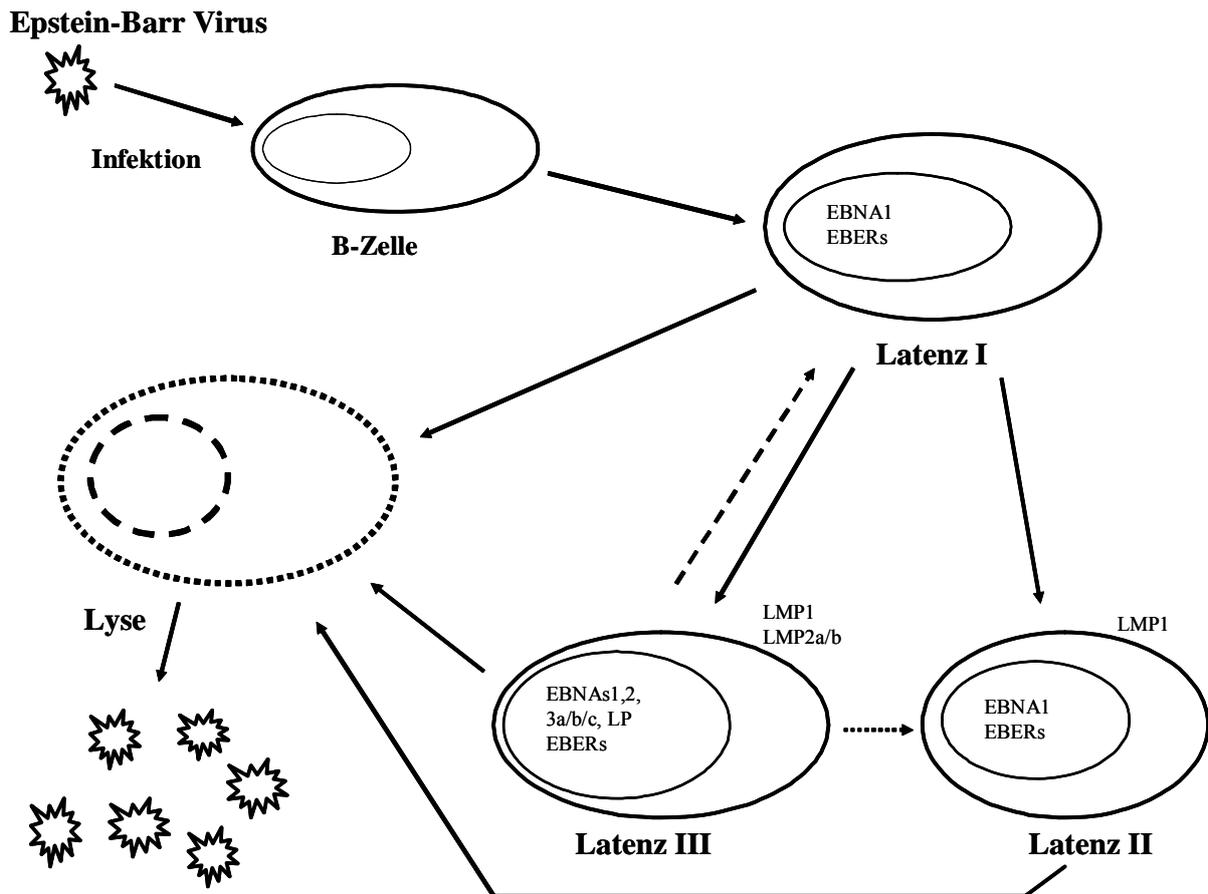
Die Übertragung von EBV erfolgt meist durch Speichel. Nach Eintritt in den Mundraum infiziert das Virus Epithelzellen des Rachens und des Zungenrandes [76] und vor allem gewebeinfiltrierte B-Lymphozyten [77]. Diese besitzen auf ihrer Oberfläche die höchste Dichte von CD21, dem Rezeptor für die Komplementkomponente C3d. Daran bindet sich der Glycoproteinkomplex gp220/350 des Epstein-Barr Virus und vermittelt die Aufnahme in die B-Zellen [78]. Diese Infektion verursacht eine polyklonale Aktivierung der B-Lymphozyten mit Folge einer massiven CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort (virusspezifische zytotoxische T-Zellen) [79, 80], welche auch die klinischen Symptome der Infektiösen Mononukleose verursachen kann. Es konnte nachgewiesen werden, dass während der Erstinfektion mit EBV mehr als 50% der CD8<sup>+</sup> Lymphozyten spezifisch gegen EBV gerichtet sind [81]. Die Immunantwort richtet sich gegen Zellen, welche die Proteine des lytischen und latenten Zyklus synthetisieren [79, 80]. Auch wenn die CD8<sup>+</sup> T-Zell Antwort den Hauptteil der zellulären Immunantwort ausmacht, wird zunehmend über die zusätzliche Rolle von CD4<sup>+</sup> Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen berichtet [82-85]. Die potente antivirale T-Zell-Antwort resultiert in einer Regression infizierter B-Zellen.

#### 1.4.4.1. Latenz

Nach der lytisch verlaufenden Primärinfektion etabliert EBV eine lebenslange Latenz in ruhenden, nicht aktivierten *memory*-B-Zellen, die das Reservoir des Virus bilden. In gesunden Trägern sind 1-50 von  $10^6$  B-Zellen latent infiziert [86].

Nach der Infektion naiver B-Zellen werden zunächst alle latenten Gene exprimiert (Latenz III) was dazu führt, dass sich die naiven B-Zellen zu proliferierenden Blasten entwickeln [87]. Diese exprimieren eine limitierte Anzahl von EBV Genprodukten. Zu diesen gehören, sechs nukleäre Proteine: Epstein-Barr Virus nuklear antigen (EBNA) 1, 2, 3A/B/C und -LP), drei latente Membranproteine (LMP1 und LMP 2A/B), sowie zwei kleine, nicht-polyadenylierte RNAs (EBER1 und 2) und weitere Transkripte der BamHIA Region (BART Transkripte) [87, 88]. Die Blasten durchlaufen in den Keimzentren der Lymphknoten die Differenzierung zu ruhenden *memory*-B-Zellen, wobei die Expression viraler Antigene reduziert und schließlich die Latenz etabliert wird. Im Falle einer Teilung dieser B-Zellen, wird auch EBNA1 exprimiert, welches die Replikation des viralen Episoms und die Verteilung auf die Tochterzellen analog zu den zellulären Chromosomen sicherstellt [89].

Es ließen sich Phasen der Latenz (0-III) mit unterschiedlichen Expressionsmustern der EBV Genprodukte nachweisen (siehe Abbildung 2). In der Latenz 0, welche nicht abgebildet ist, werden EBERs, LMP2a, (EBNA1) exprimiert. Dies ist der vermutete Phänotyp von latent infizierten B-Zellen in einem normalen, EBV seropositiven Menschen [86, 90]. Das Expressionsmuster der Latenz I findet sich in vivo im Burkitt Lymphom [91, 92], die Latenz II im Nasopharynx Karzinom [93-95] und Reed Sternberg Zellen im Hodgkin Lymphom [96]. Die Latenz III konnte in Lymphoblastoiden Zelllinien in vitro [97], der Infektiösen Mononukleose in vivo [90] und in PTLD Tumorzellen in vivo [98, 99] nachgewiesen werden.



**Abbildung 2: Latente und Lytische Phase des Epstein-Barr Virus mit den Expressionsmustern der Latenzphasen I-III. Der Übergang in die Lytische Phase bedeutet die Ausschüttung infektiöser Epstein-Barr Viruspartikel und kann als Resultat einer Primärinfektion oder einer Reaktivierung auftreten.**

**Abkürzungen: EBV: Epstein-Barr Virus, EBERs : EBV encoded small RNAs, EBNA : EBV nuclear Antigen, LMP : Latent Membrane Protein, LP : Leader Protein, PTLD : Posttransplant-Lymphoproliferative Disease**

Das Epstein-Barr Virus hat einen einzigartigen Mechanismus entwickelt, um der Entdeckung durch zytotoxische T-Zellen zu entgehen. Es werden nur wenige virale Antigene exprimiert, darunter EBNA1 [90, 100]. Das EBNA1-Protein enthält eine Glycin-Alanin-Wiederholungssequenz, von der nachgewiesen werden konnte, dass sie den proteasomalen Abbau des Proteins und somit die Beladung von Major Histokompatibilitäts Komplexen (MHC), Klasse 1 Molekülen verhindert [101]. Dieser Mechanismus führt dazu, dass latent infizierte B-Zellen, von CD8+-T-Zellen nicht erkannt werden können. So persistiert EBV lebenslang in einem Individuum. Von dem Stadium der Latenz kann die virale Infektion reaktiviert werden, was zu sukzessiven Zyklen der Virusreplikation führt, mit nachfolgendem Wiedereintritt in die Latenz. Im Kontrast zu anderen Herpesviren, verfolgt EBV eine duale Strategie, um die Infektion einer großen Anzahl von Zellen sicherzustellen. Auf der einen

Seite ist das Virus in der Lage bereits infizierte Zellen zur Proliferation anzuregen und so eine massiv erhöhte Anzahl Virus-Genom tragender Zellen zu produzieren. Auf der anderen Seite, repliziert sich das Virus in der B-Zelle und es werden infektiöse Viruspartikel freigesetzt, die wiederum neue Zellen infizieren.

#### 1.4.4.2. *Übergang von der Latenten in die Lytische Phase*

Bei immunkompetenten Virusträgern findet sich im Bereich des Oropharynx immer wieder eine lytische Vermehrung des Epstein-Barr Virus. Dies bedeutet dass infektiöse Viruspartikel ausgeschüttet werden, die Membran der infizierten B-Zelle lysiert wird und die Zelle dabei zugrunde geht. Die Aktivierung des lytischen Programms scheint in *memory*-B-Zellen aufzutreten, die in lymphatischem Gewebe welches mit dem oropharyngealen Mukosa assoziiert ist rezirkulieren [102].

Die lytische Replikation beginnt mit der Expression des *immediate-early* Transkriptionsfaktors BZLF1. Dieser genügt, um den lytischen Zyklus *in vitro* zu induzieren [103]. BZLF1 initiiert eine Kaskade von Genexpressionen, beginnend mit *early* Genen, welche in die virale DNA Replikation involviert sind. In der letzten Phase des lytischen Zyklus werden die *late* Gene exprimiert. Sie codieren in erster Linie für das Strukturprotein des Kapsids und Teguments und für die in die Virusmembran eingelagerten Glykoproteine (z.B. gp350/220, BLLF1-Protein).

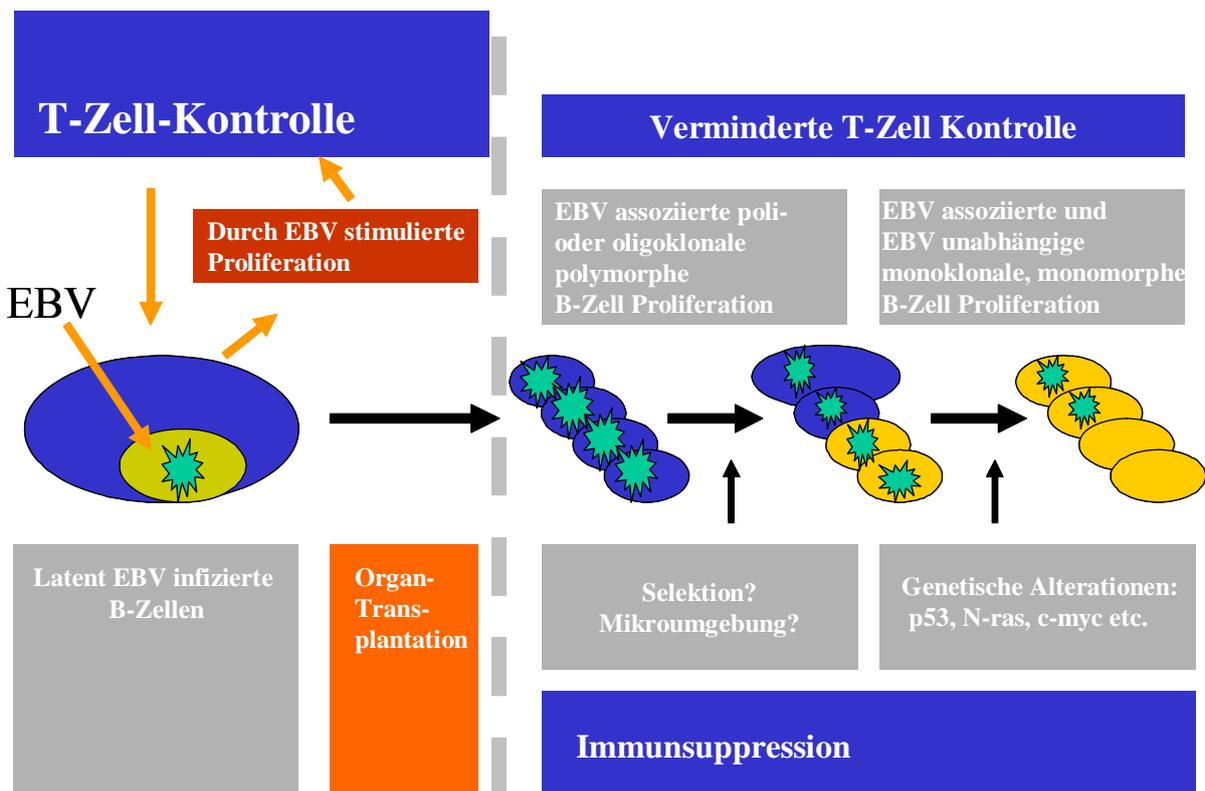
Die von infizierten B-Zellen während der lytischen Phase exprimierten Antigene können von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden, die diese eliminieren. So wird vom gesunden Immunsystem die EBV Infektion unter Kontrolle gehalten.

#### 1.4.4.3. *EBV Infektionen in immunsupprimierten Patienten*

Wie oben geschildert, existiert im gesunden Individuum eine Balance zwischen EBV Aktivität und dem Immunsystem. Geringe Mengen latent infizierter B-Zellen garantieren dem Virus die Persistenz, ohne dem Wirt zu schaden. Ändert sich das Expressionsmuster, weil vermehrt latente Gene exprimiert oder der lytische Zyklus initiiert wird, kontrollieren zytotoxische T-Zellen die Vermehrung durch Elimination infizierten Zellen. Im gesunden Immunsystem verläuft die sporadisch ablaufende Aktivierung also symptomfrei und selbstlimitierend.

Durch Immunsuppression nach Organtransplantation ist dieses empfindliche Gleichgewicht durch die Unterdrückung der T-Zell-Antwort gestört, siehe Abbildung 3. Infizierte Zellen können nun unbeschränkt proliferieren und weitere infektiöse Viruspartikel produzieren, die wiederum andere B-Zellen infizieren. Im peripheren Blut immunsupprimierter Patienten lässt sich eine signifikant erhöhte Anzahl von latent infizierten Zellen nachweisen [104-107]. Dieser Anstieg ist assoziiert mit vermehrter Virusreplikation im Oropharynx [107, 108]. Auch lässt sich im Blut im Vergleich zu Gesunden eine lytische Replikation nachweisen [109].

In einigen immunsupprimierten Patienten kommt es so zu EBV-verursachten B-Zell Proliferationen, die sich als Lymphom manifestieren können. Treten diese durch Immunsuppression nach einer Transplantation auf, nennt man sie Posttransplant-Lymphoproliferative-Disease (PTLD).



**Abbildung 3: Vereinfachtes Modell zur Pathogenese einer Posttransplant-Lymphoproliferativen Disease. Die verminderte Kontrolle von Epstein-Barr Virusinfizierten B-Zellen durch EBV spezifische zytotoxische T-Zellen resultiert aus der Immunsuppression nach Transplantation. Das Epstein-Barr Virus regt infizierte B-Zellen zur Proliferation an. Weitere Einflussfaktoren können schließlich zur Entwicklung der PTLD führen. Auch nicht EBV assoziierte Lymphome können unter Immunsuppression nach Tx entstehen. Quelle: modifiziert nach Trappe et al. [110]**

## **1.5. Aufgabenstellung**

Das Ziel der Organtransplantationen im Kindesalter sollte die Sicherstellung eines Langzeitüberlebens mit guter Lebensqualität sein. Dazu gehört, dass die Nebenwirkungen der essentiellen Immunsuppression so gering wie möglich gehalten werden und eine akute oder chronische Infektion oder Abstoßung vermieden wird. Eine weitere Folge der Langzeit Immunsuppression bei transplantierten Patienten ist, die Möglichkeit der Entwicklung verschiedener Formen maligner Erkrankungen. Bei Kindern tritt die PTLD mit 52% der Neoplasien häufiger auf als bei Erwachsenen, bei denen die Hauttumoren an erster Stelle stehen und die PTLD nur 15% der Fälle ausmacht [111].

Nach der Herztransplantation ist eine intensive Immunsuppression notwendig. Die Mehrheit der Patienten erhält eine Dreifach-Immunsuppression mit der Kombination von Calcineurininhibitor (Cyclosporin A oder Tacrolimus) und Azathioprin, MMF oder Everolimus und mit Steroiden. Während im Vergleich bei Lebertransplantationen meist ein Calcineurininhibitor als Monotherapie, eventuell in Kombination mit niedrig dosierten Steroiden ausreicht um effektiv eine Abstoßung zu verhindern [112-114].

In bisherigen Studien fand kein Vergleich der Immunsuppressiva bezüglich ihres Einflusses auf die EBV Last statt.

Ziel dieser Studie ist es herauszufinden, in welcher Weise die Calcineurininhibitoren (Cyclosporin A, Tacrolimus) und die Ergänzungsimmunosuppressiva wie Azathioprin, Mycophenolat Mofetil und Everolimus die Epstein-Barr Viruslast und das Risiko in Kindern nach Herztransplantation für die Entwicklung einer PTLD beeinflussen.

## **2. Methoden und Materialien**

### **2.1. Studienpopulation**

Die EBV Last wurde während Nachuntersuchungen zwischen 01/2003 bis 05/2007 bei 75 Patienten bestimmt, die bei Herztransplantation unter 18 Jahren alt waren. Die Eltern oder Patienten erhielten Aufklärungsbögen über die Studie. Die Analyse der Daten erfolgte anonym. Parallel zur jeder EBV Last Bestimmung wurden Immunsuppression inklusive Dosis und Spiegel, sowie andere Laborwerte der Organfunktion dokumentiert.

Ausschlusskriterien waren Chemotherapie, die Behandlung einer PTLD oder ein maligner Tumor in der Vorgeschichte.

### **2.2. Medikamentöse Therapie nach Herztransplantation**

Zur Induktion nach Transplantation wurde entweder Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) oder Basiliximab (Simulect®) verwendet. ATG wurde am Tag Null nach Transplantation und am ersten darauf folgenden Tag mit 1,5-2,5 mg/kg/d eingesetzt. Basiliximab jeweils mit 10 oder 20 mg i.v. vier und 72 Stunden nach Tx.

Wenn Muromonab-CD3 (Orthoclone®, OKT3) zur Abstoßungsbehandlung zum Einsatz kam, wurden 2 mal 5 mg i.v. verabreicht.

Prednisolon (Urbason®) wurde initial über drei Tage mit dreimal 10-15 mg/kg gegeben, dann auf 1 mg/kg reduziert und anschließend in einem Jahr auf Minimaldosen von 0,1 mg/kg/d ausgeschlichen.

Wenn als Einstiegsimmunsuppression Cyclosporin A (Sandimmun®) gewählt wurde, lag die Initialdosis bei 1-3 mg/kg/d i.v. für 10 bis 14 Tage mit einem perioperativen Zielspiegel von 250-300 ng/ml. Danach erfolgt die Umstellung auf orale Therapie mit einer Dosis von 4-8 mg/kg/d und absteigenden Zielspiegeln von 200-250 ng/ml für 3-6 Monate nach Herztransplantation. Anschließend sollte der Spiegel für 6-12 Monate Post Tx bei 150-200 ng/ml liegen und schließlich ab 12 Monaten bei 100-150 ng/ml. Die Höhe der Zielspiegels war von der Wahl des zweiten Immunsuppressivums abhängig.

Tacrolimus (FK 506, Prograf®) wurde initial mit zweimal 0,01-0,02 mg/kg i.v. für zwei Tage angesetzt und anschließend die Dosis verdoppelt. Die Spiegel sollten perioperativ bei 10-12 ng/ml liegen. Danach absteigend 8-10 ng/ml für 3 bis 6 Monate Post Tx und schließlich 6-8 ng/ml ab dem 6. Monat. Eine orale Dosierung folgte mit 0,05-0,1 mg/kg/d in 2-3 Einzeldosen.

Bei Azathioprin (Imurek®) lag die Initialdosis bei 1-2,5 mg/kg/d, ab dem 2.Tag bei 1-2 mg/kg/d. Die Dosisanpassung erfolgte nach Leukozytenzahl (Zielzahl >4000/ $\mu$ l).

Mycophenolat Mofetil (CellCept®) wird mit 10-40 mg/kg/d eingesetzt. Die Dosis kann zum einen an der Leukozyten- (absoluten Lymphozyten-)Zahl oder am Medikamentenspiegel im Plasma orientiert werden.

Everolimus (Certican®) 0,8-1,2mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche, als Zielspiegel wurde ein Wert zwischen 6-8 ng/ml angestrebt.

### **2.3. Mindestdauer der Verabreichung der Immunsuppressiva**

Patienten bei denen im Verlauf nach Transplantation die immunsuppressive Medikation umgestellt wurde, mussten diese zum Zeitpunkt der Bestimmung der Viruslast für eine Mindestdauer von 6 Monaten erhalten haben, um nicht von der Studie ausgeschlossen zu werden. Lag die Umstellung erst kurze Zeit vor der Viruslastbestimmung, wurden die Patienten in die Gruppe der vorangegangenen immunsuppressiven Kombination eingeteilt.

Patienten, die nach ihrer Transplantation nicht umgestellt wurden, wurden auch eingeschlossen, wenn ihre Operation und somit die Dauer der Verabreichung der Immunsuppressiva unter 6 Monaten lag.

### **2.4. DNA Isolierung aus Vollblut für die quantitative PCR**

Für die Analyse der Epstein-Barr Viruslast war die Entnahme von Vollblut EDTA notwendig (1,5ml bei Kindern, bzw. 2 ml bei Erwachsenen).

Im ersten Schritt werden die Erythrozyten in der Probe lysiert und entfernt. Im Anschluss findet eine DNA Extraktion statt. Zunächst werden mittels Proteinase K die DNA umgebenden Proteine, beispielsweise die Hüllenproteine von Viren, entfernt. Dann wird die freie DNA im Prozess der Festphasenextraktion während eines Zentrifugalschrittes an eine Silikalmembran gebunden. Es folgen Waschschrte zur Entfernung von kontaminierenden Proteinbruchstücken und sonstiger Substanzen. Die gebundene DNA wird danach in einem kleinen Volumen eluiert und kann bis zur Bestimmung innerhalb von 24 Stunden bei 6 bis 8°C, oder bei späterer Bestimmung bei -20°C gelagert werden.

## 2.5. Real-Time PCR Messung der EBV Last aus dem Vollblut

Diese Methode beschreibt das Verfahren zum quantitativen Nachweis von Epstein-Barr Virus DNA mittels Real-Time PCR (TaqMan).

Ein Fragment des im EBV-Genoms liegenden EBER Proteins wird mit einem spezifischen Primerpaar in einer PCR amplifiziert. Das Produkt der PCR wird mittels einer fluoreszenzmarkierten (FAM) DNA-Sonde fluorometrisch während jedes PCR Schrittes (Real-Time) nachgewiesen. Dabei wird die Nukleaseaktivität der Taq DNA Polymerase ausgenutzt, indem die Sonde während der Polymerisation gespalten und dadurch Farbstoff (FAM) vom Quencher (TAMRA) getrennt wird. Die Zunahme des Farbstoffes ist somit proportional zur Anzahl PCR-amplifizierter DNA-Fragmente der Glykoprotein DNA.

Die Anzahl der Zyklen, bei der das gemessene Fluoreszenz-Signal einen vorgegebenen Schwellenwert überschreitet, ergibt den Ct-Wert. Die Bestimmung der Ct-Werte erfolgt gemäß des SDS-Software Programms (Applied Biosystems). Für die Quantifizierung der Menge an EBV DNA in der Probe wird der Ct-Wert der Probe mit dem Ct-Wert eines Standards (Namalwa Burkitt Lymphom Zell Linie) in Beziehung gebracht. Die EBV Kopienzahl pro  $\mu\text{g}$  DNA errechnet sich durch folgende Formel:

$$EBV \text{ Kopien}/\mu\text{g DNA} = EBV \text{ Kopien}/\mu\text{l DNA} : DNA \text{ Konzentration } (\mu\text{g}/\mu\text{l})$$

Für die Angabe des Ergebnisses in Kopien/ $\mu\text{g}$  DNA wurde zusätzlich eine photometrische DNA-Quantifizierung durchgeführt

## 2.6. Datenmanagement und Statistik

Allgemein demographische Daten und Informationen über die Immunsuppression, Spiegel der Immunsuppressiva und weitere Medikationen wurden pro Patient erfasst.

Berechnet wurde für metrische Merkmale der Mittelwert, Median, Standardfehler und die Spannweite (Range). Bei ordinal oder nominal skalierten Merkmalen wurden die absolute und die relative (in Prozent) Häufigkeit berechnet. Bei Gruppenvergleichen kam der Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung. Für die Analyse der Häufigkeitsverteilung wurde der Chi-Quadrat- und Fishers-Exakter-Test (Kontingenztafeln) angewandt. Die Überlebenszeitanalyse wurde nach der Kaplan-Meyer-Methode durchgeführt. Für Untersuchungen der Korrelation zweier metrischer Variablen wurde Spearman-Rho verwandt. Zur multivariaten Analyse wurde die logistische Regression verwendet.

Es wurden die Programme SPSS Statistics für Windows (Version 11.0 und 15.0) und Microsoft Excel für Windows verwendet. Die vereinbarte Irrtumswahrscheinlichkeit lag bei  $\alpha=5\%$ . Bei jedem Test wurde die exakte Irrtumswahrscheinlichkeit „p“ berechnet. Ein p Wert von  $< 0,05$  galt als statistisch signifikant.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Umschreibung der Population**

In einer prospektiv explorativen Studie wurden 75 Patienten aus einem Kollektiv von 145 herztransplantierten Kindern, im Zeitraum von April 2003 bis Mai 2007 auf das Epstein-Barr Virus untersucht. Die Transplantationen dieser Patienten fanden zwischen Juli 1987 und November 2005 am Deutschen Herzzentrum in Berlin statt.

Die Studienpopulation setzt sich aus 35 männlichen und 40 weiblichen Patienten zusammen.

Das Alter der Patienten lag zum Zeitpunkt der Transplantation bei einem Median von 8 Jahren (Range 0,3-17,5 Jahre). Bei EBV Last Bestimmung bei 14,7 Jahren (Range 1,1-29,4 Jahre). Die Zeit zwischen Transplantation und EBV Untersuchung lag im Median bei 5,3 Jahren (Range 0,2-17,5 Jahre).

#### **3.2. Indikationen für die Herztransplantation**

Die Indikation für die Transplantation war bei 71% der Kinder eine dilatative Kardiomyopathie mit terminaler Herzinsuffizienz, bei 20% war es ein angeborener Herzfehler mit terminaler Herzinsuffizienz, bei 4% eine restriktive Kardiomyopathie und bei jeweils einem Kind war es ein Herztumor, Morbus Uhl oder eine Klappenerkrankung.

Auf Grund einer akuten terminalen Herzinsuffizienz benötigten 18/75 der Kinder eine Kreislaufunterstützung vor der Transplantation, wobei 15% ein Linksventrikuläres und 9% ein Biventrikuläres Assist Device erhielten (Typ Berlin Heart®).

#### **3.3. EBV Status vor der Transplantation**

Der serologische EBV Status vor Tx war bei 39% der Kinder positiv, 17% hatten vor der Transplantation noch keinen Kontakt mit dem Virus und waren somit negativ. Bei 44% der Patienten wurde vor Tx die EBV Serologie nicht durchgeführt. Kinder, die bei Transplantation negativ für EBV waren, waren jünger als Patienten die schon Kontakt mit dem Virus hatten ( $p=0,02$ ).

Keine Aussagen können über den EBV Status des Spenders gemacht werden, weil im Rahmen der Eurotransplant Meldung dieser Parameter bisher nicht routinemäßig bestimmt

wird. Somit fehlen die Information über ein mögliches Missmatch zwischen Spender und Empfänger.

### **3.4. CMV Status vor und nach Transplantation**

Ein CMV Missmatch, das heißt der Spender war positiv und der Empfänger negativ, bestand bei 29% der Patienten. Eine behandlungsbedürftige CMV Infektion nach der Transplantation bekamen 12/75 Kinder (16%), wobei 9/11 mit einer CMV Infektion auch ein Missmatch hatten.

### **3.5. Induktion**

Jeder Patient erhielt nach Herztransplantation im Deutschen Herzzentrum Berlin eine Induktionstherapie am Tag eins und zwei nach Transplantation. Es wurde in diesem Kollektiv hauptsächlich ein polyklonaler Anti-Lymphozyten/Thymozyten-Antikörper verwendet, das heißt in 75% der Fälle ATG der Firma Biotest (Tecelac®), in 16% ATG vom Kaninchen (Thymoglobulin®) von Genzyme. In 7% der Fälle wurde der IL-2-Rezeptor-Antagonist Basiliximab (Simulect®) verabreicht. Ein Patient erhielt zur Induktion ATG-Fresenius®.

Des Weiteren zählte zur Standardtherapie direkt nach Tx, Methylprednisolon (Urbason®) über zwei bis drei Tage mit jeweils drei mal 25mg/kg und darauf folgendes absteigendes Kortisonschema.

### **3.6. Einstiegsimmunsuppression**

Als Einstiegsimmunsuppression nach Herztransplantation wurde bei 57% der Patienten eine Kombination aus Cyclosporin A (Sandimmun®) und Azathioprin (Imurek®) gewählt. Zweithäufigste Kombination war Cyclosporin A und Mycophenolat Mofetil (MMF, CellCept®) mit 25%. Das Medikament Everolimus (Certican®) zusammen mit Cyclosporin kam bei 12% zum Einsatz. Bei zwei Patienten wurde Tacrolimus jeweils in Kombination, entweder mit MMF oder Everolimus verwendet. Cyclosporin als Monotherapie wurde bei einem Patienten verabreicht.

Bei 69% der Patienten wurde die Immunsuppression im Verlauf mindestens einmal umgestellt. Die Gründe für die Umstellung der Medikation waren entweder reduzierte Resorption zusammen mit Organdysfunktion, Zeichen einer akuten oder chronischen

Abstoßung des Transplantats oder andere spezifische Nebenwirkungen wie Niereninsuffizienz, Gingivahyperplasie, Hirsutismus und epileptische Anfälle.

### 3.7. EBV Infektion

In der Studienpopulation hatten 75% der Patienten eine Viruslast von unter 2000 Kopien/µg DNA, 25% zeigten erhöhte EBV Lasten von über 2000 Kopien/µg DNA. Der Median lag bei 142 Kopien/µg DNA bei einem Range von 0-89.247 Kopien/µg DNA. Insgesamt lag bei 27% der Patienten die Viruslast unter der Nachweisgrenze.

### 3.8. Faktoren welche die EBV Last beeinflussen

Im Folgenden sollen die Variablen CMV Mismatch, CMV Infektion nach Transplantation, EBV Serostatus vor Tx und das Geschlecht als Einflussfaktoren auf die EBV Last untersucht werden (siehe Tabelle 3). Alle weiteren Parameter werden gesondert und ausführlicher in den einzelnen Kapiteln behandelt.

**Tabelle 3: Einfluss von CMV Mismatch und Infektion nach Transplantation, EBV Status vor Tx und Geschlecht auf die EBV Last**

		EBV Last [Median (Range)] Kopien/µg DNA	P
<b>CMV Mismatch</b>	Ja	140 (0-22.325)	0,969
	Nein	145 (0-89.247)	
<b>CMV Infektion nach Tx</b>	Ja	104 (0-22.325)	0,810
	Nein	145 (0-89.247)	
<b>EBV Status vor Tx</b>	Positiv	121 (0-20.730)	0,006
	Negativ	3502 (0-24.232)	
<b>Geschlecht</b>	m	93 (0-14.175)	0,017
	w	331 (0-89.247)	

Tabelle 3 zeigt, dass Kinder die bei Tx positiv für EBV waren, eine geringere Viruslast aufwiesen. Die EBV positiven Patienten waren bei Transplantation im Schnitt 9 Jahre alt, während Kinder die bei Tx EBV negativ waren im Schnitt 2,5 Jahre alt waren (p=0,02)

### 3.8.1. Einfluss des Alters der Patienten auf die EBV Last

Patienten mit EBV Lasten von unter 2000 Kopien/ $\mu$ g DNA, waren zum Zeitpunkt der Transplantation im Median 10 Jahre alt, während Patienten mit erhöhten Viruslasten von über 2000 Kopien/ $\mu$ g DNA dagegen nur 3,3 Jahre alt waren ( $p=0,054$ ).

Abbildung 4 veranschaulicht, dass Patienten die zum Zeitpunkt der Transplantation <10 Jahre alt waren, ein erhöhtes Risiko für eine erhöhte EBV Last haben.

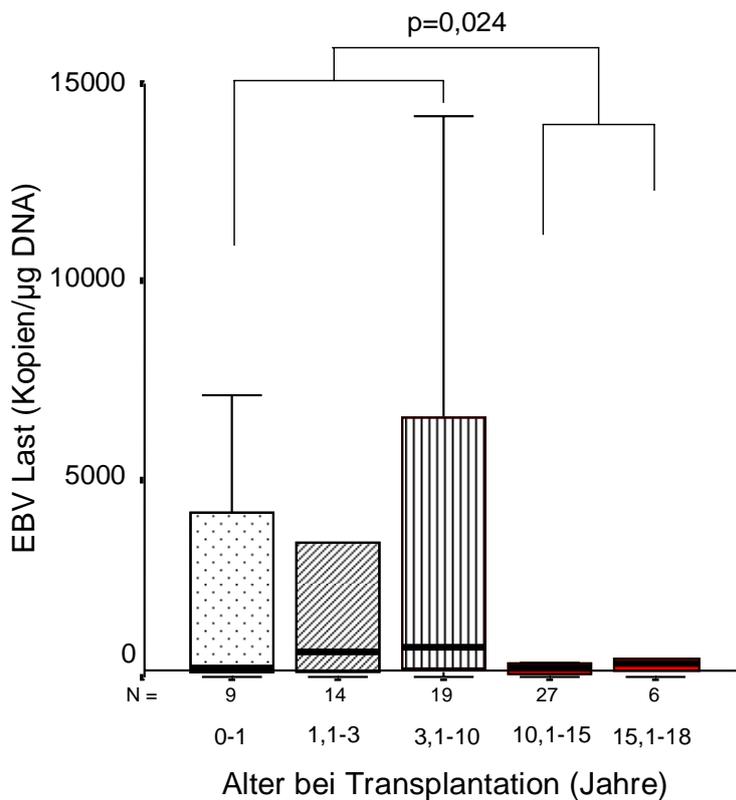


Abbildung 4: Die EBV Last (Kopien/ $\mu$ g DNA) in Abhängigkeit des Alters bei Transplantation. Kinder unter 10 Jahren haben signifikant erhöhte EBV Lasten im Vergleich zu Älteren.

### 3.8.2. Einfluss der Polyklonalen Antithymozyten Antikörper (ATG) und Interleukin (IL)-2-Rezeptor-Antikörper

Erhielten die Patienten drei oder mehr Gaben von polyklonalem ATG, hatten sie eine statistisch signifikant erhöhte EBV Last gegenüber Patienten mit keiner oder nur einer Gabe ATG (siehe Tabelle 4).

**Tabelle 4: Anzahl Gaben ATG und EBV Last [Median (Range)]**

<b>Anzahl ATG Gaben</b>	<b>0-1</b>	<b>2</b>	<b>&gt;3</b>	<b>p-Wert</b>
<b>EBV Last (Kopien/µg DNA)</b>	109 (0-20.730)	28 (0-89.247)	638 (0-35.732)	0,03
<b>Anzahl Patienten</b>	22	21	28	n.s.
<b>Alter bei Tx (Jahre)</b>	12,5 (1,4-17,5)	5,7 (0,4-16,4)	4,8 (0,32-15,6)	0,004
<b>Zeit zwischen Tx und EBV Last (Jahre)</b>	5,3 (0,2-13,4)	2,2 (0,5-13,2)	10,1 (0,2-17,5)	0,025
<b>Alter bei EBV (Jahre)</b>	16 (5,8-29,4)	9,5 (1,1-25,8)	15,4 (5,2-27)	0,4
<b>Anzahl der Abstoßungen</b>	1 (0-3)	1 (0-2)	3 (0-7)	0,002

*Vergleich Spalte 2 (2 Gaben ATG) versus Spalte 1 (0-1 Gabe ATG) und 3 (>3 Gaben ATG) nicht signifikant.*

Vergleicht man die verschiedenen Arten der Anti-Thymozyten Antikörper Tecelac® und Thymoglobulin®, lassen sich zwischen beiden Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Epstein-Barr Viruslast feststellen.

In diesem Kollektiv erhielten 5/74 (7%) den (IL)-2-Rezeptor-Antikörper Basiliximab. Keiner der Patienten erhielt im Verlauf zur Abstoßungsbehandlung ATG, ein Patient jedoch einmalig OKT3. Drei der fünf Patienten liegen mit ihrer EBV Last unter der Nachweisgrenze, zwei der Patienten hatten leicht erhöhte Viruslasten (<2000 Kopien/µg DNA), darunter der Patient der OKT3 erhielt.

Es ließ sich kein signifikanter Unterschied in der EBV Last zwischen den polyklonalen antithymozythen Antikörpern und Basiliximab nachweisen. Allerdings hat keiner der Patienten, welche Basiliximab zur Induktion erhielten, eine PTLD entwickelt.

### **3.8.3. Einfluss des Calcineurininhibitors auf die EBV Last (Cyclosporin A vs. Tacrolimus)**

In der untersuchten Gruppe von 75 Patienten erhielten 85% Cyclosporin A (CyA) und 15% Tacrolimus (Tac) als Basisimmunsuppressivum. Der Grund für den höheren Anteil an Patienten mit CyA ist, dass Tacrolimus bei Durchführung der Studie noch nicht zur Immunsuppression nach Herztransplantation zugelassen war, und nur in Ausnahmefällen, zum Beispiel bei CyA Malabsorption, eingesetzt wurde.

Die Art des Calcineurininhibitors hatte keinen Einfluss auf die EBV Last. Die Anzahl der Patienten mit einer Epstein-Barr Viruslast unter der Nachweisgrenze betrug 25% (CyA) vs.

36% (Tac) und mit erhöhter Viruslast 25% vs. 27% (CyA vs. Tac). Beide Calcineurininhibitoren haben, wie Abbildung 5 veranschaulicht, einen ähnlichen Einfluss auf die EBV Last. Es gibt keinen statistisch signifikanten Unterschied ( $p=0,575$ ).

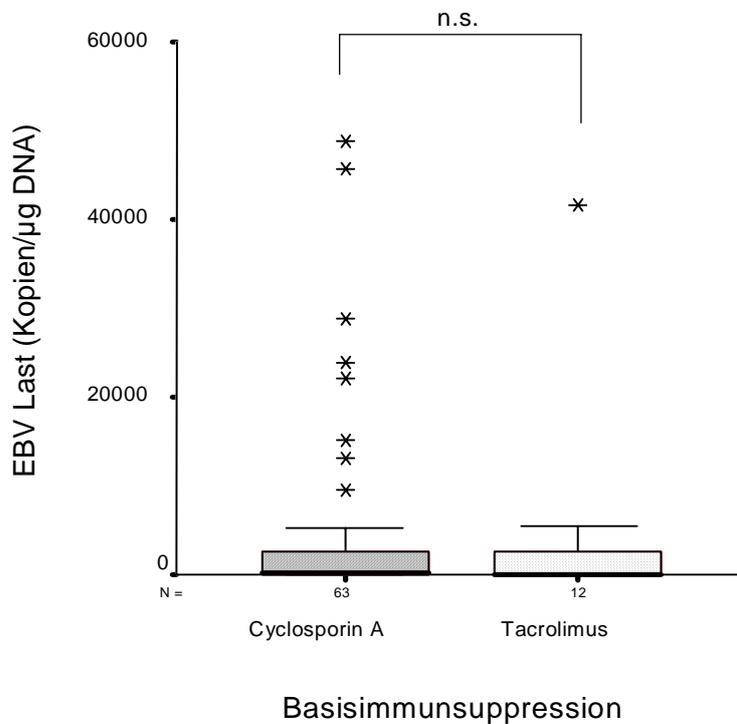
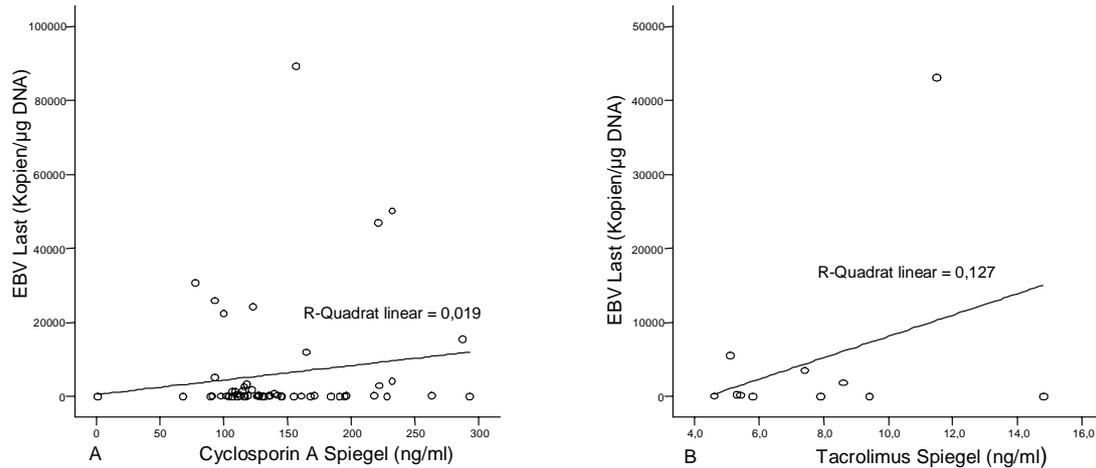


Abbildung 5: EBV Last in Abhängigkeit der Art des Calcineurininhibitors (Cyclosporin A vs. Tacrolimus) ohne statistisch signifikanten Unterschied bezüglich der Epstein-Barr Viruslast

#### 3.8.4. Einfluss der Calcineurininhibitorspiegel auf die EBV Last

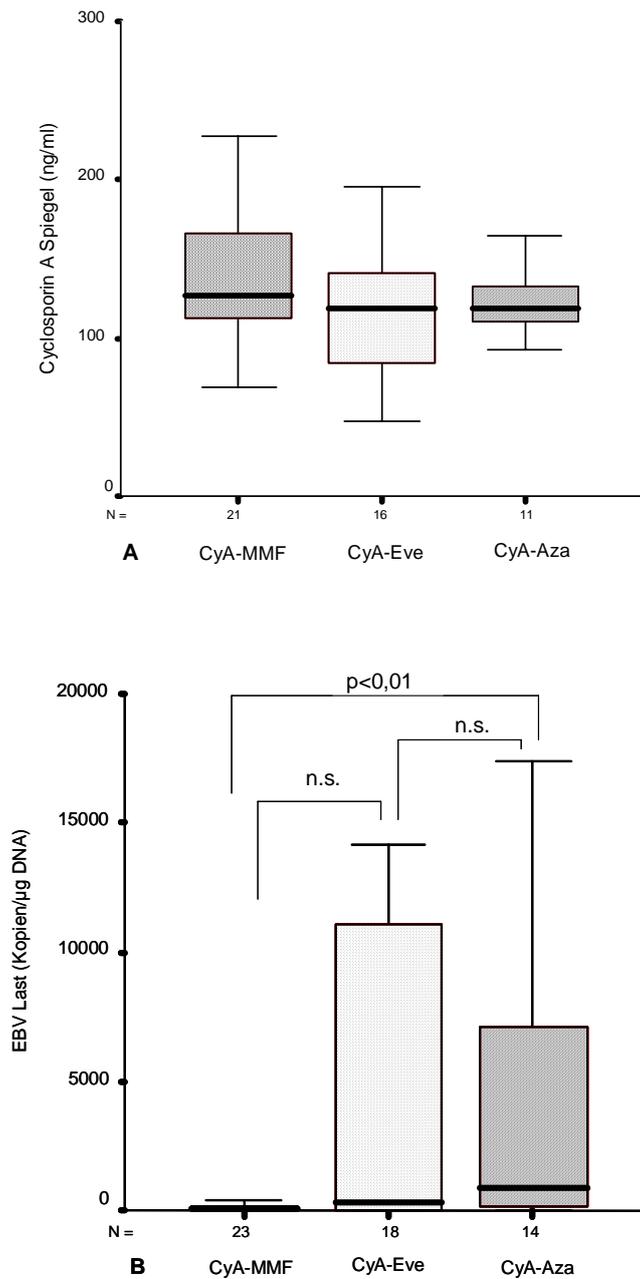
Parallel zur Viruslast Bestimmung wurden die Spiegel von Cyclosporin A und Tacrolimus im Blut der Patienten registriert. Abbildung 6 zeigt zwei Streudiagramme, welche die Viruslast gegen den jeweiligen CyA- und Tacrolimus Spiegel auftragen. Eine statistisch signifikante Korrelation konnte nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 6: Der Calcineurininhibitorspiegel in Abhängigkeit von der Epstein-Barr Viruslast**

Da die Ergänzungsimmunosuppressiva unterschiedlich hohe Spiegel der Calcineurininhibitoren erfordern wird im folgendem der Calcineurininhibitorspiegel im Zusammenhang mit dem in Kombination verabreichten Immunsuppressivum betrachtet. Abbildung 7A stellt die Unterschiede in der Höhe des CyA Spiegels in Zusammenhang mit dem zweiten Immunsuppressivum dar.

In der Azathioprin Gruppe ist der CyA Spiegel im Vergleich zu den anderen Gruppen niedriger, weil unter anderem die Transplantation der Patienten im Schnitt länger zurück liegt (im Median 10,6 Jahre vs. MMF 5 und Everolimus 3 Jahre; jeweils  $p < 0,05$ ). Abbildung 7B zeigt die drei Kombinationen und ihren Einfluss auf die EBV Last. Trotz der geringern CyA Spiegel in der Gruppe CyA-Azathioprin haben die Patienten höhere Viruslasten. Patienten welche die Kombination CyA-MMF erhalten, haben trotz hoher CyA Spiegel niedrige Viruslasten (CyA MMF vs. CyA-Aza  $p < 0,01$ ). Nähere Erläuterungen finden sich im Kapitel 3.8.5 Einfluss der immunsuppressiven Kombinationen.

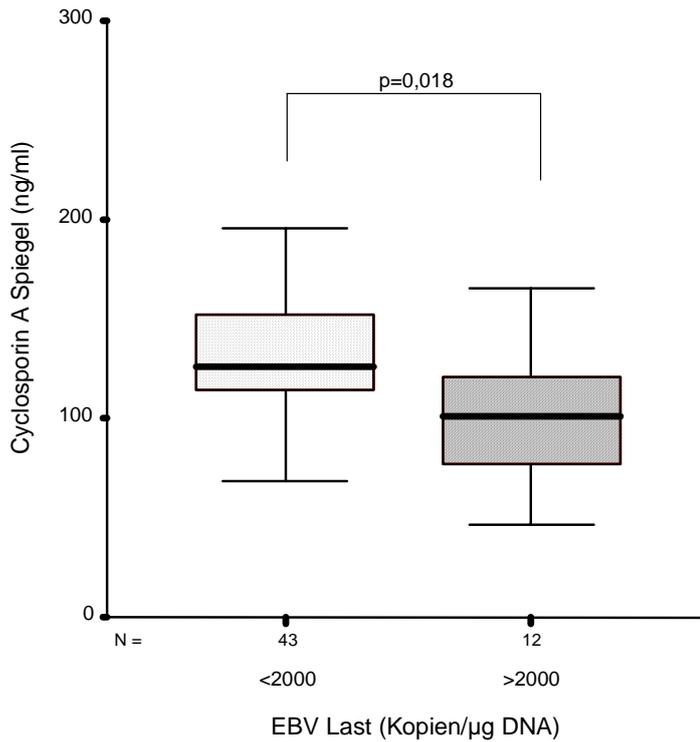


**Abbildung 7: A** Höhe des Cyclosporin A Spiegel in Abhängigkeit von der Kombination mit dem zweiten Immunsuppressivum; keine signifikanten Unterschiede zwischen den CyA Spiegeln der drei Kombinationen

**B** EBV Last in Abhängigkeit von der Kombinationstherapie: die Patienten mit CyA-MMF hatten signifikant geringere Viruslasten als Patienten mit CyA-Azathioprin

Abkürzungen EBV : Epstein-Barr Virus; CyA : Cyclosporin A; MMF : Mycophenolat Mofetil; Eve : Everolimus; Aza : Azathioprin

In Abbildung 8 wird untersucht, wie sich der Cyclosporin A Spiegel auf die EBV Last auswirkt. Zu erkennen ist dass Patienten mit über 2000 Kopien/µg DNA signifikant geringere Cyclosporin A Spiegel haben als Patienten mit nicht erhöhten Viruslasten.

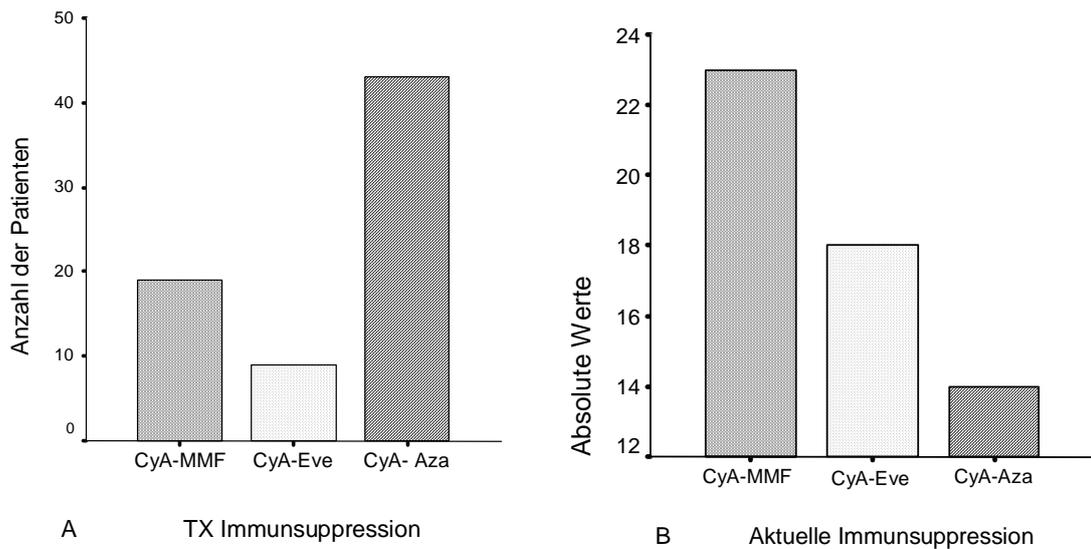


**Abbildung 8: Cyclosporin A Spiegel in Abhängigkeit von der EBV Last in Kategorien in über und unter 2000 Kopien/µg DNA eingeteilt.**

### 3.8.5. Einfluss der immunsuppressiven Kombinationen

Zwischen Transplantation und EBV Screening wurden bei den meisten Patienten eine oder mehrere Änderungen der Medikation vorgenommen (Vergleich Kapitel 3.6 Einstiegsimmunsuppression).

Abbildung 9A und B geben eine Übersicht über die Verteilung der Immunsuppressiva nach Transplantation und aktuell zum Zeitpunkt des EBV Screenings. War zur Transplantation noch die Kombination aus Cyclosporin A und Azathioprin die häufigste, sind es zum Zeitpunkt der EBV Untersuchungen Cyclosporin A-MMF und an zweiter Stelle Cyclosporin A-Everolimus.



**Abbildung 9: A Immunsuppression nach Transplantation, B Immunsuppression zum Zeitpunkt des EBV Screenings**

Um den Einfluss der Immunsuppression auf die EBV Last/ PTLD zu untersuchen, wurden die drei Hauptkombinationen (CyA-Azathioprin, CyA-MMF, CyA-Everolimus) der immunsuppressiven Medikamente ausgewertet. Am Ende des Kapitels befindet sich eine vergleichende Übersicht der verschiedenen Therapien in Bezug auf die Epstein-Barr Viruslast.

Jede Medikamentenkombination wird unter festgelegten Gesichtspunkten betrachtet:

1. Alter der Gruppe zur Transplantation und zum EBV Screening
2. Zeit zwischen Tx und EBV Screening
3. Verteilung der Geschlechter
4. Einstiegsimmunsuppression
5. EBV Status vor der Transplantation
6. Abstoßungen, welche die Patienten unter der immunsuppressiven Therapie hatten, die sie zum Zeitpunkt der EBV Last Bestimmung erhielten
7. EBV Lasten
8. Dauer der Verabreichung der Immunsuppressiva

3.8.5.1. Cyclosporin A (Sandimmun®) & Azathioprin (Imurek®)

In der CyA-Azathioprin Gruppe ist mit einem Median von 10,6 Jahren die längste Zeit zwischen Transplantation und EBV Last Bestimmung vergangen. In der Tabelle 5 sind die demographischen Daten der Patienten dargestellt und Informationen über die Abstoßungen und den EBV Status vor Transplantation zusammengefasst.

**Tabelle 5: Demographische Daten der Gruppe CyA-Azathioprin [Median(Range)]**

	Patientenanzahl	14/75	
	M:F	5:9	
	Alter bei Tx (Jahre)	9 (0,6-16)	
	Alter bei EBV Last (Jahre)	18,7 (5,3-29,4)	
	Zeit zwischen Tx und EBV (Jahre)	10,6 (4,7-14,2)	
	Dauer Gabe CyA-Aza (Jahre)	10,9 (4,6-14,6)	
	CyA Spiegel in ng/ml	118 (93-171)	
	Abstoßungen unter CyA-Azathioprin	Keine	57%
		1-3	36%
		>3	7%

Abkürzungen: Tx : Transplantation, EBV : Epstein-Barr Virus, Aza : Azathioprin; CyA : Cyclosporin A

Bei 10/14 dieser Kinder war die Kombination aus CyA-Aza die Einstiegsimmunsuppression, 3/14 wurden von CyA- Everolimus und bei einem Patienten von CyA-MMF auf CyA- Aza umgestellt. Keiner dieser Patienten erhielt >1 Jahr nach Tx ein Steroid zur unterstützenden Immunsuppression.

Alle, bis auf zwei Rejektionen, fanden im ersten Jahr nach der Transplantation statt. Eine Therapie mit Prednisolon erfolgte in 87% der Fälle, die restlichen waren steroidresistente Abstoßungen, welche mit ATG behandelt wurden.

Die Epstein-Barr Viruslast lag im Median bei 904 Kopien/µg DNA (Range 0-20.730 Kopien/µg DNA). Bei einem Patienten lag die Viruslast unter der Nachweisgrenze. Eine erhöhte Viruslast (>2000 Kopien/µg DNA) hatten 29% (4/14) der Patienten.

Patienten die vor Tx bereits EBV positiv (6/14) waren, haben im Median eine Viruslast von 1348 (Range 56-20.730) Kopien/µg DNA im Vergleich zu Patienten mit negativen prä Tx EBV Status (2/14), deren eine Viruslast bei 12.240 (Range 7094-17.387) Kopien/µg DNA lag. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant (Chi-Quadrat p=0,024).

3.8.5.2. Cyclosporin A (Sandimmun®) & Mycophenolat Mofetil (Cell Cept®)

Die Kombination aus CyA und MMF wurde in der Studienpopulation mit 31% am häufigsten verabreicht. Eine Übersicht über die demographischen Daten dieser Gruppe liefert Tabelle 6.

**Tabelle 6: Demographische Daten der Gruppe CyA-MMF [Median(Range)]**

EBV Status vor Transplantation	Patientenanzahl	23/75	
<p>Legend:          ■ Positiv          ■ Negativ          □ Unbekannt</p>	M:F	14:9	
	Alter bei Tx (Jahre)	10,6 (0,3-16,4)	
	Alter bei EBV Last (Jahre)	15,8 (1,1-25,8)	
	Zeit zwischen Tx und EBV (Jahre)	5 (0,6-17,5)	
	Dauer Gabe CyA-MMF (Jahre)	2 (0,13-6,5)	
	CyA Spiegel in ng/ml	127 (69- 287)	
	Abstoßungen unter CyA-MMF	Keine	57%
		1-3	34%
		>3	9%

Abkürzungen: Tx : Transplantation, EBV : Epstein-Barr Virus, MMF : Mycophenolat Mofetil; CyA : Cyclosporin A

Bereits seit der Transplantation erhielten 9/23 der Kinder die Kombination aus CyA und MMF. Die anderen 14 wurden im Verlauf umgestellt, wobei 12 Patienten als Einstiegsimmunsuppression CyA-Azathioprin erhielten, einer CyA als Monotherapie und einer CyA-Everolimus. Ein Glucocorticoid zur begleitenden Immunsuppression erhielten 67% der Patienten.

Innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation traten unter CyA-MMF 70% der Rejektionen auf. Bei der Behandlung genügte in 83% der Fälle die Gabe von Steroiden, 17% mussten mit ATG therapiert werden.

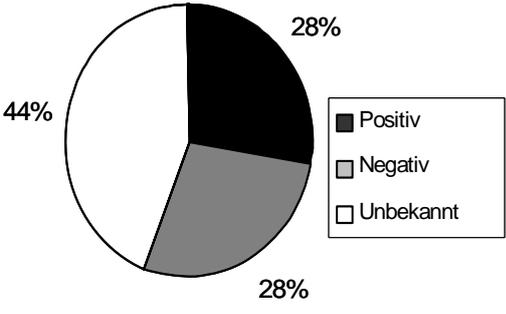
Bei den 23 Patienten lag die EBV Last bei einem Median von 50 Kopien/µg DNA (Range 0-3272 Kopien/µg DNA). Bei acht Patienten (35%) war sie unter der Nachweisgrenze. Insgesamt hatte 1/23 Patienten eine erhöhte Viruslast (>2000 Kopien/µg DNA).

Die männlichen Patienten dieser Gruppe hatten im Schnitt eine Viruslast von 55 Kopien/µd DNA, die weiblichen von 50 Kopien/µg DNA (p=n.s.).

3.8.5.3. Cyclosporin A (Sandimmun®) & Everolimus (Certican®)

In der Tabelle 7 sind die demographischen Daten der Patienten dargestellt, die CyA und Everolimus erhalten.

**Tabelle 7: Demographische Daten der Gruppe CyA-Everolimus [Median(Range)]**

EBV Status vor Transplantation	Patientenanzahl	18/75	
	M:F	11:7	
	Alter bei Tx (Jahre)	8,7 (0,6-15,6)	
	Alter bei EBV Last (Jahre)	13,6 (2,8-23)	
	Zeit zwischen Tx und EBV (Jahre)	2,1 (0,2-14,1)	
	Dauer Gabe CyA-Eve (Jahre)	0,8 (0,24-2,2)	
	CyA Spiegel in ng/ml	118 (47-196)	
	Abstoßungen unter CyA-Eve	Keine	83%
		1-3	17%
		>3	0%

Abkürzungen: Tx : Transplantation, EBV : Epstein-Barr Virus, Eve : Everolimus; CyA : Cyclosporin A

CyA-Everolimus de novo nach Tx erhielten 8/18 Patienten, jeweils 5/18 wurden von CyA-MMF und CyA-Azathioprin auf CyA-Everolimus umgestellt, 73% der Patienten erhielten ein Glucocorticoid.

Mit 83% verblieben in der CyA- Everolimus Gruppe die meisten Patienten ohne Abstoßung. Bei den Patienten mit Rejektion fanden diese zu 66% im ersten Jahr nach Transplantation statt und wurden klinisch diagnostiziert. Alle Abstoßungen konnten mit Steroiden erfolgreich behandelt werden.

Bei den 18 Patienten lag die Viruslast bei einem Median von 314 Kopien/ $\mu$ g DNA (Range 0-89.250). Bei 6/18 (33%) Patienten lag die Viruslast unter der Nachweisgrenze. Insgesamt hatten 7/18 (39%) Patienten eine mit über 2000 Kopien/ $\mu$ g DNA liegende, erhöhte Viruslast.

Der Everolimus Spiegel lag im Schnitt bei 4,9 ng/ml (Range 1,6-8,3ng/ml). Es gab keine statistisch signifikante Korrelation zwischen EBV Last und Everolimus Spiegel.

War der EBV Status vor Tx positiv, lag die Viruslast bei einem Median von 314 Kopien/ $\mu$ g DNA, war der Status negativ lag die EBV Last bei 528 Kopien/ $\mu$ g DNA, ohne statistisch signifikanten Unterschied.

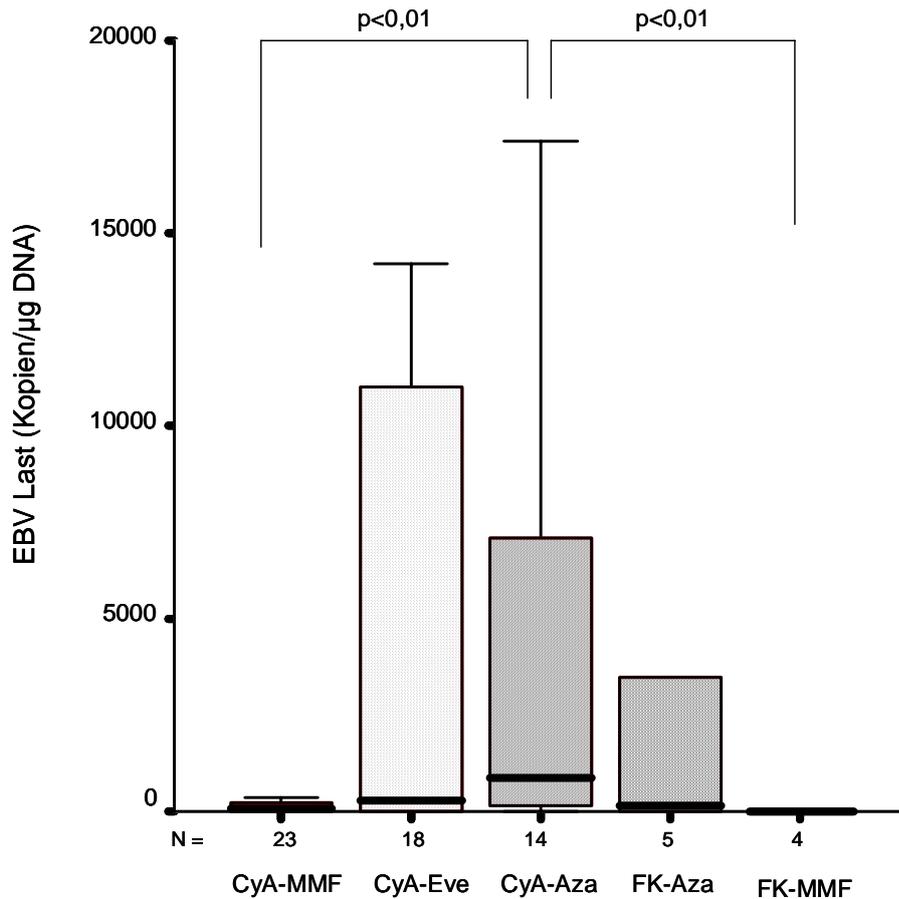
Die Viruslast der männlichen Patienten lag bei einem Median von 93, der der weiblichen bei 528 Kopien/ $\mu$ g DNA (nicht signifikant).

### 3.8.6. Direkter Vergleich der immunsuppressiven Kombinationen

Folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die EBV Lasten der verschiedenen immunsuppressiven Kombinationen. CyA-MMF und CyA-Everolimus haben dabei die geringsten Viruslasten. Patienten die CyA-Azathioprin erhalten, haben die höchsten Viruslasten.

**Tabelle 8: Vergleich der EBV Last: Immunsuppressive Kombinationen [Median (Range)]**

	<b>CyA- Azathioprin</b>	<b>CyA-MMF</b>	<b>CyA- Everolimus</b>	<b>FK- Azathioprin</b>
<b>N</b>	14	23	18	5
<b>Dauer Gabe Kombination (Jahre)</b>	10,9	2	0,8	1,5
	(4,6-14,6)	(0,13-6,5)	(0,24-2,2)	(0,8-2,5)
<b>Alter bei EBV Last (Jahre)</b>	18,7	15,8	13,6	8,2
	(5,3-29,4)	(1,1-25,8)	(2,8-23)	(3,2-25)
<b>Mediane Viruslast (Kopien/µg DNA)</b>	904	50	314	166
	(0-20.730)	(0-3272)	(0-89.247)	(0-43.036)
<b>&gt;2000 Kopien/µg DNA</b>	29%	4%	39%	40%
<b>Unter der Nachweisgrenze</b>	7%	35 %	33%	20%



**Abbildung 10: Vergleich der Epstein-Barr Viruslasten zwischen den häufigsten immunsuppressiven Kombinationen; CyA-MMF und FK-MMF mit jeweils signifikant geringeren Viruslasten im Vergleich zu CyA-Azathioprin; alle anderen Kombinationen unterscheiden sich bezüglich der EBV Last nicht.**

Wie Abbildung 10 veranschaulicht bringen die jeweiligen Basisimmunsuppressiva in Kombination mit Mycophenolat Mofetil einen signifikanten Vorteil bezüglich der EBV Last gegenüber der Kombination CyA-Azathioprin. Gegenüber der Kombination Tacrolimus-Azathioprin ist kein signifikanter Vorteil nachweisbar.

### 3.8.7. Einfluss der Virustatika auf die EBV Last

In dem Kollektiv aus 75 Patienten, erhielten 11 Patienten ein Virustatikum. Von diesen Patienten befanden sich vier im ersten Jahr nach Transplantation.

Patienten, die ein Virustatikum erhielten, hatten im Median eine Viruslast von 93 (0-89.247) Kopien/µg DNA. Im Vergleich zu Patienten ohne Virustatikum, deren EBV Last bei 154 (0-43.036) Kopien/µg DNA liegt ( $p=0,602$ ).

### **3.8.8. Inzidenz von Abstoßungen**

#### *3.8.8.1. Abstoßungen im ersten Jahr nach Herztransplantation*

Abstoßungen nach Herztransplantation treten gehäuft in der postoperativen Phase auf, in der die Immunantwort erhöht und die Immunsuppression zum Teil noch nicht effizient genug ist. Darum erfolgte eine Analyse des ersten Jahres nach Transplantation für die drei großen Gruppen der Einstiegsimmunsuppressiva: CyA-Azathioprin, CyA-MMF und CyA-Everolimus, welche 96 % des Gesamtkollektivs entsprechen. Tabelle 9 vergleicht diese drei Gruppen der initialen Immunsuppressiva bezüglich der Rejektionen im ersten Jahr.

**Tabelle 9: Vergleich der Inzidenz von Abstoßungen verschiedener immunsuppressiver Kombinationen im ersten Jahr nach HTX**

	<b>CyA- Azathioprin</b>	<b>CyA- MMF</b>	<b>CyA- Everolimus</b>
Anzahl Patienten	n=44	n=19	n=9
Keine Abstoßungen	44 %	26 %	67 %
Mittlere Anzahl Abstoßungen	1,4	1,4	0,4
Mittlere Anzahl ATG zur Behandlung	0,4	0,1	0,1
Mittlere Anzahl von Steroidbehandlungen	1	1,3	0,3

Patienten mit CyA-Everolimus hatten signifikant weniger Abstoßungen im ersten Jahr nach Transplantation verglichen mit CyA-MMF ( $p < 0,05$ ). Kein signifikanter Unterschied bestand zwischen CyA-Azathioprin vs. CyA-Everolimus oder vs. CyA-MMF.

#### *3.8.8.2. Abstoßungen nach einem Jahr nach Transplantation*

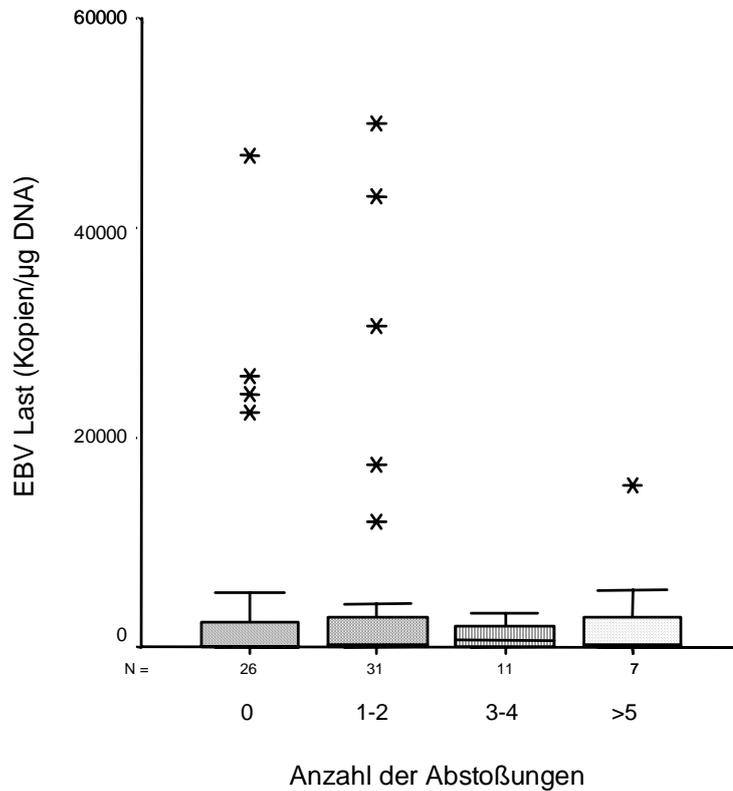
Nach dem ersten postoperativen Jahr verblieben 72% der Patienten abstoßungsfrei. Abstoßungen traten vor allem bei Patienten mit den Kombinationen CyA-Azathioprin und CyA-MMF auf (siehe Tabelle 10). Es findet sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Kombinationen bezüglich der Anzahl der Abstoßungen und der Gaben ATG. Bei nur einem Patienten trat eine Abstoßung unter CyA-Everolimus auf.

**Tabelle 10: Abstoßungen nach dem ersten Jahr nach Herztransplantation**

	<b>CyA-Azathioprin</b>	<b>CyA-MMF</b>
Anzahl der Pat. mit Abstoßungen >1 Jahr post Tx	10/75	12/75
Mittelwert Abstoßung (Range)	0,24 (0-2)	0,7 (0-7)
Mittelwert Behandlung mit ATG (Range)	0,2 (0-1)	1 (0-3)

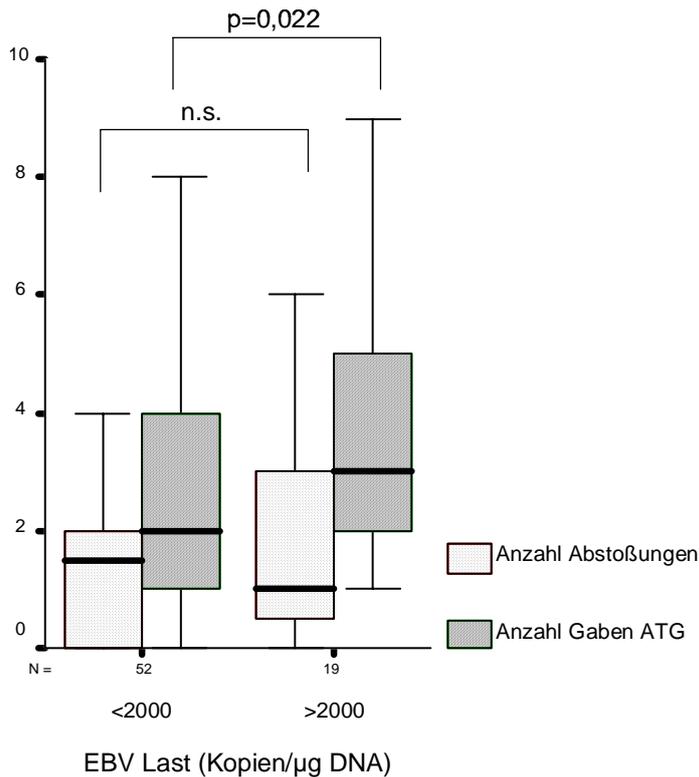
3.8.8.3. Einfluss von Abstoßungen auf die EBV Last

Abbildung 11 vergleicht die Anzahl der Abstoßungen, unabhängig vom Zeitpunkt der Abstoßung, in Abhängigkeit von der EBV Last. Insgesamt hat die Anzahl der Abstoßungen keinen Einfluss auf die Höhe der EBV Last.



**Abbildung 11: Epstein-Barr Viruslast in Zusammenhang mit der Anzahl der Abstoßungen (unabhängig vom Zeitpunkt der Abstoßung). Zwischen den abgebildeten Kategorien besteht kein statistisch signifikanter Unterschied.**

Vergleicht man aber die Gesamtzahl der Gaben ATG, die zur Induktion und Abstoßungsbehandlung notwendig waren, so ergibt sich ein signifikanter Einfluss von ATG auf die EBV Last (siehe Abbildung 12).



**Abbildung 12: Anzahl der Abstoßungen und Anzahl der Gaben ATG in Abhängigkeit von der EBV Last (< 2000 versus >2000 Kopien/μg DNA). Kein Unterschied bezüglich der Anzahl der Abstoßungen (2 versus 1 Abstoßung), jedoch haben Patienten mit einer Viruslast von über 2000 Kopien/μg DNA signifikant häufiger ATG (2 versus 3 Gaben ATG) erhalten, als Patienten mit nicht erhöhten Viruslasten.**

### 3.9. Multivariatanalyse der Einflussfaktoren auf die EBV Last

Die multiple logistische Regression dient zur multivariaten Analyse mit der eine Vorhersage des Einflusses bestimmter Faktoren über ein Vorhandensein oder Nichtvorhandensein einer EBV Last von über 2000 Kopien/μg DNA möglich ist. Die Wirkung eines einzelnen Einflussfaktors auf eine erhöhte EBV Last kann nicht pauschal angegeben werden. Das folgende Modell berücksichtigt den unterschiedlichen Grad des Einflusses auf eine erhöhte EBV Last. Der p-Wert muss in Zusammenschau mit den univariaten Analysen gewertet werden.

**Tabelle 11: Logistische Regression der Einflussfaktoren auf die EBV Last [Median (Range)]**

<b>Faktor</b>		<b>P</b>
Alter bei Transplantation	5,4 (0,11-17,5) Jahre	0,057
Geschlecht	W 35 (47%) M 40 (53%)	0,017
Anzahl Abstoßungen	1,7 (0-7)	0,737
Anzahl Gaben ATG	3,4 (0-29)	0,402
MMF	27 (36%)	0,001
Azathioprin	19 (25%)	0,085
Everolimus	18 (24%)	0,280

Unter den Immunsuppressiva hat der Antimetabolit MMF den größten Einfluss auf die EBV Last, sein Vorhandensein macht eine EBV Last unter 2000 Kopien/ $\mu$ g DNA sehr wahrscheinlich. Die anderen Ergänzungsimmunosuppressiva haben keinen signifikanten Einfluss, wobei Azathioprin tendenziell zu höheren EBV Lasten führt. Das weibliche Geschlecht scheint einen Risikofaktor für erhöhte EBV Lasten darzustellen. Junges Alter stellt sich in der Tendenz als Einflussfaktor dar. Im Zusammenhang mit der Gewichtung ist die Anzahl der Gaben ATG kein Einflussfaktor für erhöhte EBV Lasten. Wie bereits im univariaten Teil der Ergebnisse beschrieben sind Anzahl der Abstoßungen und eine CMV Infektion nach Transplantation keine Risikofaktoren und auch in der logistischen Regression keine Einflussgrößen auf die EBV Last.

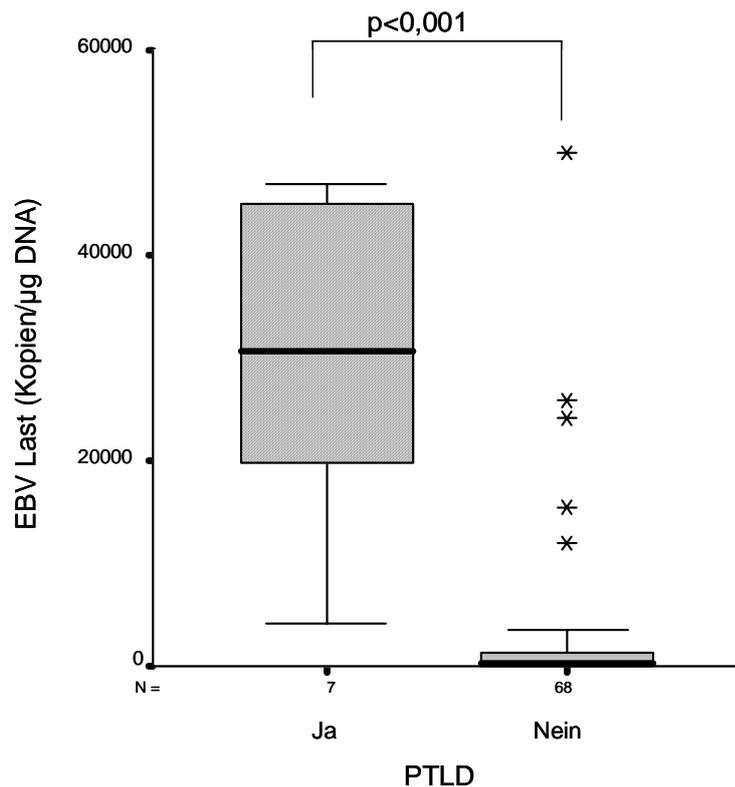
### **3.10. Posttransplant-Lymphoproliferative Disease (PTLD)**

Sieben von 75 Patienten (9,3%) entwickelten eine PTLD. Das Alter bei Diagnosestellung lag bei einem Median von 8,1 (Range 1,3-12) Jahren. Die mediane Zeit zwischen Transplantation und Diagnose war 3,7 (Range 1,5-9,5) Jahre. Für Informationen über die Lokalisation der PTLD, die histologische Klassifikation entsprechend den WHO-Richtlinien und die EBV Assoziation siehe Tabelle 12. Einundsiebzig Prozent der Patienten entwickelten die PTLD unter CyA-Azathioprin. Im Vergleich zu Patienten ohne PTLD war die mediane EBV Last signifikant erhöht: 29.028 (Range 14.175- 89.250) Kopien/ $\mu$ g DNA vs. 104 (0-24.232) Kopien/ $\mu$ g DNA in Patienten ohne PTLD ( $p < 0,001$ ), siehe Abbildung 13.

**Tabelle 12: Klinische Charakteristika bei Patienten mit PTLD**

Nr.	Alter bei Diagnosestellung (Jahre)	Postoperative Zeit (Jahre)	Lokalisation PTLD	PTLD Histologie	EBV Histologie	Immunsuppression Vor Diagnose PTLD	Chirurgie	Medikamentöse Behandlung
1	7,0	2,0	Tonsillen	Frühläsion (I)	+	CyA-Aza	Ja	Rituximab, Antiviral
2	10,2	1,5	Pharynx/ Tonsillen	Polymorph, B-Zell (II)	+	CyA-Eve	Ja	Rituximab
3	1,3	0,5	Abdominale Lymphknoten	Monomorph, B-Zell (III)	+	CyA-MMF	Ja	Polychemotherapie
4	8,6	2,5	Kopf-/Hals Lymphknoten	Monomorph, B-Zell (III)	+	Tac-Aza	Nein	Rituximab
5	4,7	3,7	Abdominale Lymphknoten	Monomorph, B-Zell (III)	+	CyA-Aza	Ja	Rituximab, Antiviral
6	12	9,5	Lunge + Lymphknoten	T-Zellreich (IV): Angiozentrisches Lymphom	+	CyA-Aza	Nein	Rituximab
7	6	2,7	Auge	n.d.	n.d.	CyA-Aza		Rituximab

Abkürzungen: PTLD: Post-Transplant-Lymphoproliferative Disease; EBV: Epstein-Barr Virus; NHL: Non-Hodgkin Lymphom; CyA: Cyclosporin A; Aza: Azathioprin; Eve: Everolimus; MMF: Mycophenolat Mofetil; n.d.: not done



**Abbildung 13: Vergleich der Epstein-Barr Viruslast in Patienten mit und ohne PTLD. Die Viruslast ist in der PLTD Gruppe signifikant erhöht.**

Bei allen Patienten, konnte die PTLD erfolgreich therapiert werden und die Patienten verblieben bisher rezidivfrei. Patientin 5 fiel nach der chirurgischen Behandlung mit anschließender Rituximab Gabe erneut mit hohen Viruslasten auf, wobei die Histologie nach

Tonsillektomie keinen Hinweis auf ein Rezidiv der PTLD erbrachte. Aufgrund hoher Viruslasten wurde jedoch erneut mit Rituximab behandelt. Es gab keine PTLD assoziierten Todesfälle.

### 3.11. Evaluierung des Tests der EBV Last Bestimmung bezüglich der PTLD

Um Patienten mit erhöhter Viruslast zu identifizieren und zu entscheiden, wann die Entwicklung einer PTLD wahrscheinlich ist, haben wir verschiedene Grenzwerte für Epstein-Barr Viruslasten bestimmt und getestet, bei welchem die Sensitivität, Spezifität, der Positiv- (PPW) und Negativ-Prädiktive-Wert (NPW) am höchsten sind und somit der Test die höchste Aussagekraft, bezüglich der Diagnose einer PTLD hat. Für die Grenzwerte und die statistischen Parameter siehe Tabelle 13.

**Tabelle 13: Evaluierung des Tests der EBV Last Bestimmung bezüglich der Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer PTLD**

<b>Grenzwerte (Kopien/<math>\mu</math>g DNA)</b>	<b>PPW (%)</b>	<b>NPW (%)</b>	<b>Sensitivität (%)</b>	<b>Spezifität (%)</b>	<b>AUC</b>	<b>p Werte</b>
2000	31	100	100	81	0,906	0,001
3000	38	100	100	86	0,928	0,001
10.000	60	100	100	94	0,971	<0,001

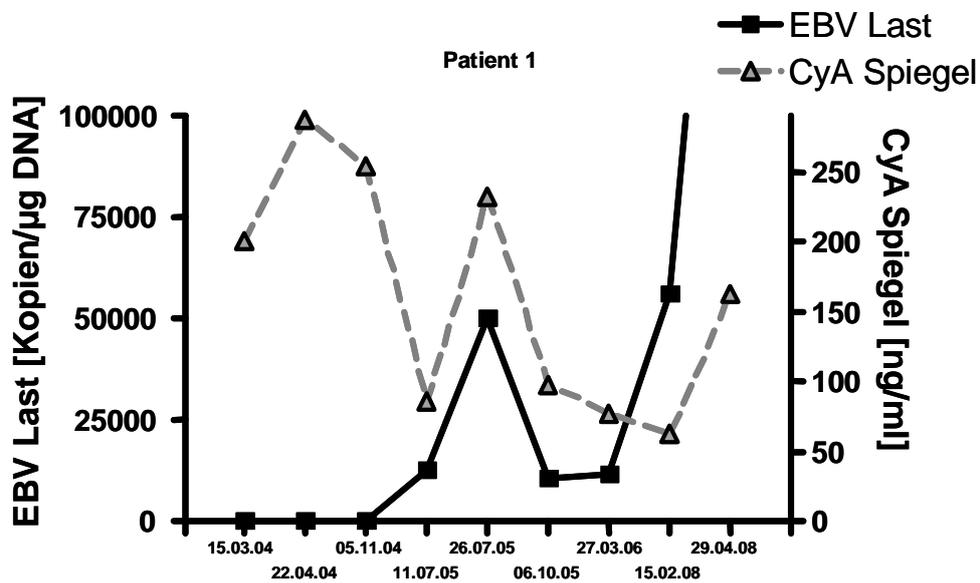
Abkürzungen: PPW: Positiv-Prädiktiver-Wert; NPW: Negativ-Prädiktiver-Wert, AUC: Area under the curve

### 3.12. Einfluss medikamentöser Interventionen auf die EBV Last

Eine Auswahl Patienten, die im Verlauf mit hohen Viruslasten auffielen, wurde in regelmäßigen Abständen kontrolliert, wobei sowohl die EBV Last als auch der Cyclosporin A Spiegel verzeichnet wurden. Die beiden Parameter wurden parallel in Diagrammen aufgetragen (siehe Abbildung 14-Abbildung 18). Für die Demographischen Daten der im Verlauf betrachteten Patienten siehe Tabelle 14.

**Tabelle 14: Demographische Daten der Patienten mit Verlaufsbeobachtung**

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5
Jahr Tx	2004	2004	2000	1992	2003
Diagnose	dKMP	dKMP	rKMP	dKMP	dKMP
Assist	Nein	BVAD	Nein	LVAD	LVAD
Alter bei Tx	14	8,7	9	16	2,5
Geschlecht	m	w	m	w	w
EBV Status vor Tx	Negativ	Unbekannt	Positiv	Positiv	Negativ
CMV Mismatch/Infektion	Ja/ja	Nein/nein	Nein/nein	Ja/ja	Nein/nein
Induktion	ATG	ATG	Simulect	ATG	ATG
Initiale Immunsuppression	CyA-MMF	CyA-Eve	CyA-Aza	CyA-Aza	CyA-MMF
Immunsuppression im Verlauf	CyA-Eve	CyA-Eve	CyA-MMF CyA-Eve	CyA-Eve	CyA-Aza CyA-Mono
Abstoßungen	2	Keine	1	Keine	Keine
Gaben ATG	5	2	Keine	1	2
Bemerkung			Abstoßungsbehandlung mit OKT3	präTx Wilms Tumor	



**Abbildung 14: Verlauf der EBV Last und Cyclosporin A Spiegel von Patient 1: Im November 2004 erfolgte die Umstellung von CyA-MMF auf CyA-Everolimus, es folgte ein Anstieg der EBV Last.**

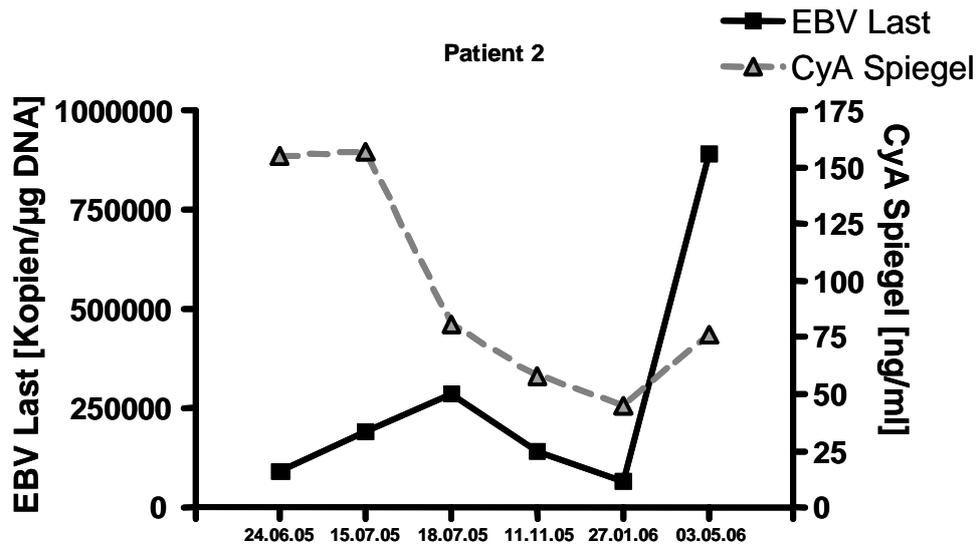


Abbildung 15: Verlauf der EBV Last und Cyclosporin A Spiegel von Patient 2: Alle Werte unter CyA-Everolimus. Die EBV Lasten sind stark erhöht. Eine Senkung der EBV Last durch Absenkung des CyA Spiegels ist nachweisbar, jedoch selbst bei CyA-Spiegeln von 45 ng/ml sinkt die EBV Last nicht unter 60.000 Kopien/ $\mu$ g DNA.

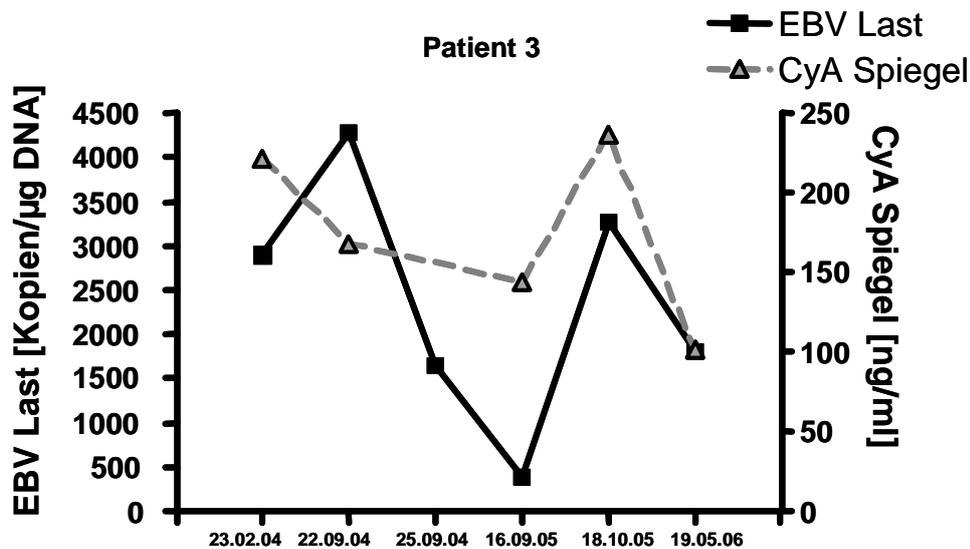


Abbildung 16: Verlauf der EBV Last und Cyclosporin A Spiegel von Patient 3: Zunächst erhöhte EBV Lasten unter CyA-MMF. Dann absinken auf Werte von unter 500 Kopien/ $\mu$ g DNA. Nach der Umstellung auf CyA-Everolimus am 21.09.05 folgte ein erneuter Anstieg der EBV Last.

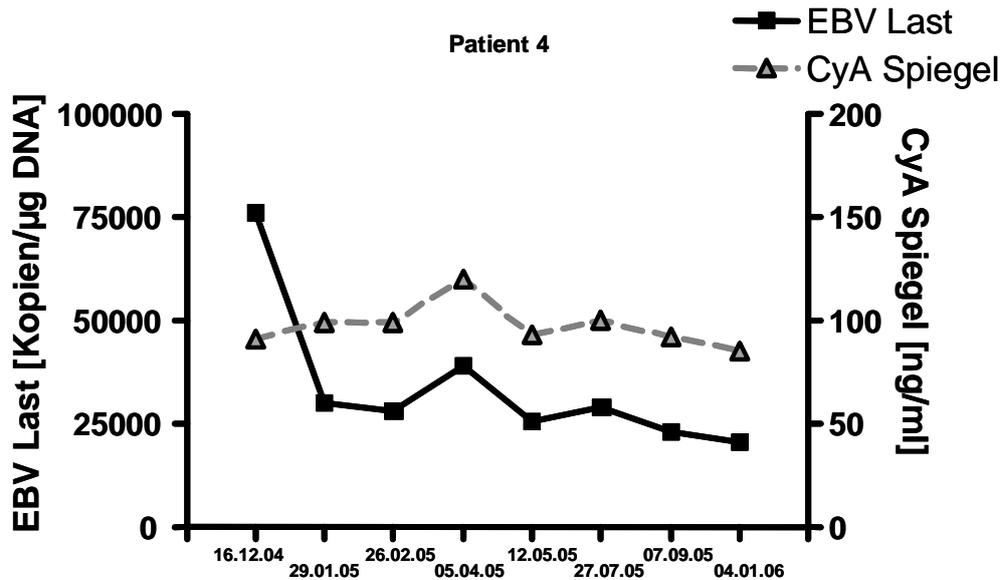


Abbildung 17: Verlauf der EBV Last und Cyclosporin A Spiegel von Patient 4: Alle Werte unter CyA-Azathioprin. Nahezu paralleler Verlauf der EBV Last und des CyA Spiegels, jedoch selbst bei einem CyA Spiegel von <100 ng/ml kein Absinken der Viruslast unter 20.000 Kopien/µg DNA.

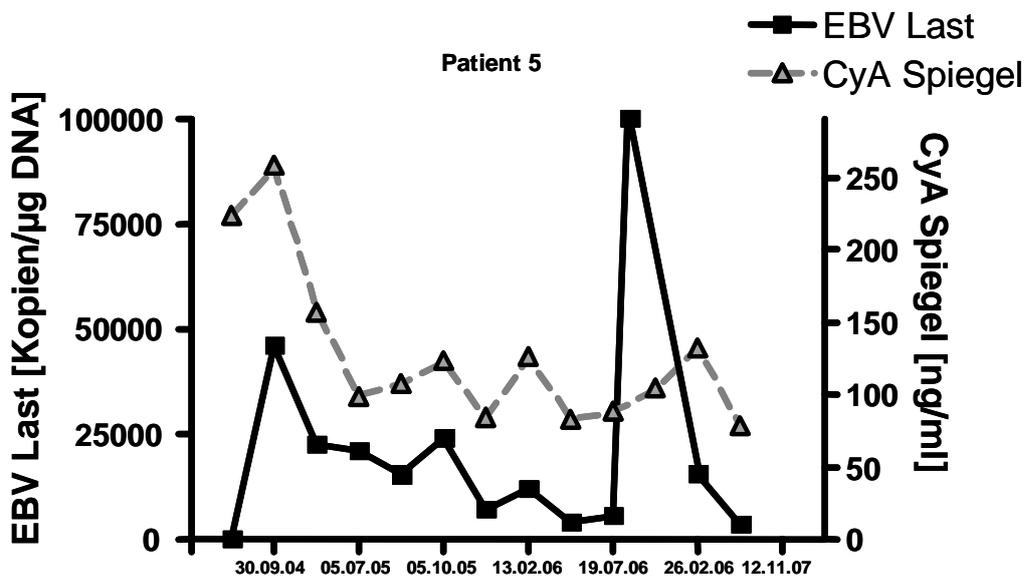


Abbildung 18: Verlauf der EBV Last und Cyclosporin A Spiegel von Patient 5: Am 05.07.05 Umstellung von CyA-Azathioprin auf Monotherapie mit CyA aufgrund hoher EBV Lasten, am 16.02.07 Umstellung auf CyA-Everolimus mit zunächst starkem Anstieg der EBV Last und anschließendem Abfall auf 3800 Kopien/µg DNA

## **4. Diskussion**

Ziel dieser Querschnittsstudie ist die Bestimmung der EBV-Replikation im Blut bei Kindern nach Herztransplantation. Durch die Analyse der eingeschlossenen Patienten konnten Risikofaktoren für eine erhöhte Epstein-Barr Viruslast und für die Entstehung einer PTLD aufgezeigt werden. Eine erhöhte EBV-Replikation kann durch eine EBV-Reaktivierung oder die EBV-Primärinfektion unter Immunsuppression bedingt sein und im Verlauf zu einer unkontrollierten Proliferation der B-Lymphozyten und Manifestation der PTLD führen.

### **4.1. Wertigkeit der EBV Last Bestimmung nach Herztransplantation**

In der Nachbetreuung transplantierte Kinder ist die Diagnose einer PTLD weiterhin schwierig zu stellen. Zunehmende Inzidenzen mit multiplen Manifestationen einer PTLD erfordern eine Risikoeinschätzung bei Kindern nach Herztransplantation [2, 115]. Ziel ist es daher, eine Methode für ein klinisches Monitoring zu entwickeln um frühzeitig Hochrisikopatienten zu identifizieren und einer therapeutischen Intervention zuführen zu können. Denn je früher eine PTLD erkannt wird, umso besser kann eventuell der Verlauf der Erkrankung und die Invasivität beeinflusst werden. Im Kindesalter spielen vor allem der EBV Serostatus von Empfänger und Spender vor Tx, Alter zum Zeitpunkt der Transplantation, die Intensität und Art der Immunsuppression im Verlauf nach Transplantation, Episoden von Abstoßungen und deren Behandlungen eine wesentliche Rolle. Die Bestimmung der EBV Last im Blut der Patienten ist ein bedeutsamer Parameter um die Aktivität von EBV zu messen und damit auch das Risiko für die Entstehung einer PTLD [58, 59, 61, 115]. Eine wesentliche Überraschung dieser Studie ist, dass sich bei einer Mehrheit der herztransplantierten Kinder im Verlauf nach Transplantation eine aktive Replikation von EBV im Blut nachweisen und damit auch eine Dynamik der Virusinfektion und des Risikos für eine PTLD im Verlauf bestimmen lässt. Aufgrund dieser Erfahrung haben wir in unserem Zentrum die EBV-Last als Verlaufsparmater etabliert und bestimmen sie routinemäßig bei allen Patienten nach Herztransplantation.

## **4.2. Methodik und Materialien zur Bestimmung der Epstein-Barr**

### **Viruslast**

Die Real-time quantitative PCR (Polymerase-Chain-Reaction) zur EBV Last Bestimmung ist in Deutschland noch kein standardisiertes Verfahren und auch das Material welches zur Bestimmung der Viruslast verwendet wird variiert je nach Methodik. Die Möglichkeit zur Bestimmung im Plasma, Serum, Vollblut, PBMC (peripheral blood mononuclear cells) [116-120] und Sekreten (Speichel etc.) zeigt die Vielzahl der Möglichkeiten auf. Daher sind EBV Last Werte unterschiedlicher Labore und Kliniken, welche nicht die gleichen Methoden und Materialien verwenden, nur sehr eingeschränkt vergleichbar. Zusätzlich gibt es deutliche Unterschiede in der Sensitivität und Spezifität der jeweiligen Methoden. Die Detektion im Plasma ist nur bei einer lytischen Replikation sicher möglich, wobei ein negativer Befund im Plasma immer noch eine positive und auch hohe EBV Last im Vollblut zulässt. Bei einer EBV-Persistenz spielt vor allem die Anzahl der Lymphozyten im Blut eine entscheidende Rolle für die EBV-PCR im Vollblut.

Der Vorteil der Vollblut- oder PBMC-Analyse im Gegensatz zu Plasma oder Serum besteht auch darin, dass der Zell-assoziierte Virusnachweis früher erfolgen kann und auch länger nach einer antiviralen Behandlung nachweisbar bleibt [121]. Ein erhältlicher Standard zur Bestimmung der real-time PCR für EBV ist die Namalwa-Burkitt-Lymphom-Zell-Linie, die wir in dieser Studie verwendet haben [119]. Eine Standardisierung der EBV-PCR ist für die Vergleichbarkeit der Messwerte weiterhin dringend erforderlich

## **4.3. Evaluation verschiedener Grenzwerte der Epstein-Barr**

### **Viruslasten**

Die Epstein-Barr Viruslast wurde auch in Patienten mit PTLD bestimmt. Wir untersuchten Grenzwerte von 2000; 3000 und 10.000 Kopien/ $\mu$ g DNA. Für die Analysen dieser Studie wurden aufgrund zentrumsspezifischer und internationaler Kooperationen (Rooney et al.) ein Grenzwert von 2000 Kopien/mg DNA festgelegt [122]. Dieser „cut-off“-Wert kann bereits einen Hochrisikopatienten für die Entwicklung einer PTLD identifizieren (Sensitivität 100%, Spezifität 81%, Positiv-prädiktiver-Wert 31%, AUC 0,91,  $p=0,001$ , siehe Tabelle 13). Die Grenzwerte von 3000 oder 10.000 Kopien/ $\mu$ g DNA weisen eine gleich bleibende Sensitivität aber eine höhere Spezifität auf. Der Positiv-prädiktive-Wert steigt bei den Grenzwertberechnungen nicht über 60% an, was daran liegt, dass es Patienten gibt, die

erhöhte Viruslasten vorweisen ohne bisher eine PTLD entwickelt zu haben. Patienten mit einer EBV assoziierten PTLD hatten erhöhte Viruslasten, so dass der Negativ-prädiktive-Wert bei allen „cut-off“ Werten von 2000, 3000 und 10.000 Kopien/ $\mu$ g DNA bei 100% lag. Diese Grenzwerte haben sich somit etabliert und ihre Wertigkeit ist für den Kliniker gegeben. Patienten mit einer Viruslast von über 2000 Kopien/ $\mu$ g DNA haben ein erhöhtes Risiko für eine PTLD [115]. Bei Werten von über 2000 Kopien/ $\mu$ g DNA sollten also regelmäßige Kontrollen der Epstein-Barr Viruslast erfolgen und die Immunsuppression sollte vermindert oder verändert werden (beispielsweise von Azathioprin zu MMF oder Everolimus) [58, 60, 115, 123].

Um insgesamt bessere Vorhersagewerte zu erzielen, wäre eine groß angelegte multizentrische, prospektive Studie, mit größeren Patientenzahlen notwendig.

#### **4.4. PTLD**

Posttransplant-Lymphoproliferative Disease ist eine komplexe Erkrankung nach Transplantation. Sie ist die dritt bis viert häufigste Ursache für Mortalität beziehungsweise verantwortlich für eine Erhöhung der Morbidität nach Herztransplantation im Kindesalter [2]. Die Genese beinhaltet ein Zusammenspiel multipler Faktoren und genetischer Regulatorien [110]. Bei Kindern beträgt die EBV Assoziation einer PTLD bis über 80%. Ursächlich spielt nicht nur die T-Zell-Inhibition durch Immunsuppressiva eine Rolle, sondern auch die durch Medikamente ungewollte Unterstützung der Expansion EBV infizierter B-Zellen durch Erhöhung von Interleukin 6; 10; TGF- $\beta$  und eine steigende Resistenz gegenüber immunologisch induzierter Apoptose durch die Expression anti-apoptotischer Gene [123-127]. Jedoch bildet die immunsuppressive Therapie nach Organtransplantation die Grundlage zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen. Es existiert eine bestimmte Anzahl prädisponierender Faktoren, die das Risiko des einzelnen Individuums eine PTLD zu entwickeln, beträchtlich erhöhen. In unserem Patientenkollektiv entwickelten 7/75 Patienten eine PTLD (siehe Tabelle 12 und Abbildung 13), was 9,3% des Gesamtkollektivs entspricht und somit in der bisher publizierten Inzidenz nach Herztransplantation bei pädiatrischen Patienten entspricht [2, 20]. Fünf dieser sieben Patienten entwickelten die PTLD unter der Kombination unter Cyclosporin A und Azathioprin. Konform mit der bisherigen Studienlage ist bei Patienten mit Azathioprin im Vergleich zu MMF das Risiko der PTLD erhöht [128, 129]. Die Lokalisationen der PTLD Fälle unserer Studie sind äußerst heterogen und reichen vom Lymphknotenbefall im HNO-Trakt bis zur abdominellen und pulmonalen Manifestation.

Ein Patient entwickelte eine PTLD im Auge, die jedoch histologisch nicht untersucht werden konnte. Aufgrund hoher Epstein-Barr Viruslasten und einer Remission des klinischen Befundes nach autologer T-Zell Therapie, gilt die Diagnose der PTLD jedoch gesichert.

#### **4.5. Faktoren die zu einer erhöhten EBV Last führen**

##### **4.5.1. Alter , EBV Status bei Transplantation und EBV Mismatch**

In unserer Studie konnten wir zeigen, dass Kinder mit negativen EBV Status zum Zeitpunkt der Transplantation ein geringeres Alter und nach Transplantation signifikant erhöhte Viruslasten hatten (Tabelle 3). Dieser Unterschied wird deutlicher, wenn man die Patienten unter und über zehn Jahren zum Zeitpunkt der Transplantation vergleicht: Patienten unter zehn Jahren haben signifikant höhere Viruslasten (Abbildung 4). Konsekutiv dazu haben Patienten mit einem positiven EBV Status zum Zeitpunkt der Transplantation signifikant niedrigere EBV-Lasten. Daraus lässt sich folgern, dass Säuglinge und Kleinkinder unter zehn Jahren mit einem negativen EBV Status zum Zeitpunkt der Transplantation ein erhöhtes Risiko für eine inadäquate immunologische EBV-Kontrolle und damit für eine PTLD haben. Ursächlich ist wahrscheinlich, dass sie ihren ersten Kontakt mit dem Epstein-Barr Virus unter bereits bestehender Immunsuppression haben und die Möglichkeiten zur Entwicklung einer adäquaten T-Zell-Antwort eingeschränkt sind. Ein geringes Alter zum Zeitpunkt der Transplantation ist aber auch häufiger mit einem EBV Mismatch (Empfänger negativ und Spender positiv) assoziiert. Diese Konstellation ist ebenfalls ein Hauptrisikofaktor für eine erhöhte EBV Last und die Entwicklung einer PTLD bei Kindern nach Transplantation [5, 8, 113, 130]. Um Aussagen über ein mögliches Mismatch bei Spender und Empfänger machen zu können, ist EBV Spenderstatus entscheidend. Jedoch wurde im Rahmen der Eurotransplant Anmeldung dieser Parameter bisher noch nicht routinemäßig bestimmt. Daher konnte der Spenderstatus für EBV bei einer Mehrheit der Patienten in dieser Studie nicht ermittelt werden. Um Hochrisikopatienten mit Mismatch zu identifizieren, sollte eine routinemäßige Bestimmung des EBV Status von Spender und Empfänger angestrebt werden

##### **4.5.2. Polyklonale Antithymozyten Antikörper**

Der Gebrauch von Polyklonalen Antithymozyten Antikörpern, ATG und OKT3, zur Induktion nach Transplantation und zur Behandlung akuter, zellulärer Abstoßungen, stellt einen Risikofaktor für die Entwicklung einer PTLD dar [16, 40-42]. In unserer Studie war der

Einsatz von mehr als drei Gaben ATG mit einer signifikant erhöhten EBV Last assoziiert (siehe Tabelle 4 und Abbildung 12), wobei der zeitliche Abstand der EBV Last zur ATG-Gabe über sechs Monate betrug, um einen direkten Effekt (T-Zell Depletion) auszuschließen. Die Gabe von ATG scheint einen entscheidenden Einfluss auf die T-Zell spezifische Kontrolle und Abwehr einer möglichen EBV-Infektion und Reaktivierung im Langzeitverlauf zu haben (siehe auch 4.5.1). Ein Vergleich der EBV Lasten von Patienten die einen Antithymozyten Antikörper (ATG) erhalten haben mit Patienten, die IL-2-Rezeptorantagonisten erhielten, ist aufgrund der geringen Anzahl von Patienten mit Basiliximab nicht möglich. Jedoch hat keiner der Patienten unter einer Basiliximab Therapie eine PTLD entwickelt. Für einen Vergleich fehlen noch randomisierte Studien. Es konnte jedoch bereits in einigen Studien gezeigt werden, dass das Risiko eine PTLD zu entwickeln durch Basiliximab Gabe im Vergleich zu ATG nicht erhöht wurde [40, 41, 128].

Die Indikation zum Einsatz von Antithymozyten Antikörpern in Kindern nach Transplantation vor allem zur Induktion sollte daher überdacht werden, da sie das Risiko zur Entwicklung eine PTLD beträchtlich erhöhen kann.

#### **4.5.3. Calcineurininhibitoren im Vergleich**

Dass die Höhe der Immunsuppression eine entscheidende Rolle spielt, wurde in vielen Studien beschrieben. Nur ist „die Höhe“ der Immunsuppression vielfach ein Synonym für den Spiegel des Hauptimmunsuppressivums, und damit der Calcineurininhibitoren Cyclosporin A oder Tacrolimus. Dass viele Patienten eine Kombinationstherapie erhalten, die wiederum einen erheblichen Einfluss auf das Immunsystem hat, wurde bisher nur in wenigen Studien betrachtet.

In mehreren Publikationen fanden sich bisher widersprüchliche Resultate bezüglich des Einflusses von Cyclosporin A oder Tacrolimus auf die Inzidenz der PTLD. Einige Studien, wiesen für Tacrolimus höhere Inzidenzen bezüglich maligner Entartungen nach, wobei hier vor allem eine erhöhte Inzidenz kutaner Malignome beschrieben wurde [123, 131, 132]. Weitere multizentrische Studien berichteten, dass Langzeit Immunsuppression mit Tacrolimus vs. Cyclosporin A in Nierentransplantierten Patienten, keinen signifikanten Unterschied bezüglich der PTLD Inzidenz aufweisen [133, 134]. Die bisherige Studienlage besagt, dass die Intensität der Immunsuppression, wiedergegeben durch die Höhe der Spiegel im Blut, ein Prädiktor für die Entwicklung der PTLD sei, was bedeuten würde, dass hohe

Spiegel eher zu malignen Erkrankungen führen, als niedrige und man einzig den Calcineurininhibitor reduzieren sollte, um Komplikationen dieser Art zu vermeiden [17, 56].

Somit ist eine entscheidende Frage, ob ein hoher Spiegel eher zu malignen Erkrankungen führen kann. Und kann man einzig durch die Reduktion des Calcineurininhibitors das Risiko einer PTLD reduzieren?

In unserer Studie war die Höhe der Epstein-Barr Viruslast unabhängig von der Art des Calcineurininhibitors, obwohl es zu beachten gilt, dass nur eine geringe Anzahl von Patienten Tacrolimus erhielt [115, 135]. Aber vor allem korrelierte die Höhe des Calcineurininhibitors im Blut nicht im positiven Sinne mit der Höhe der EBV Last [115, 135]. Patienten mit Viruslasten über 2000 Kopien/ $\mu$ g DNA und damit erhöhten Werten, hatten signifikant niedrigere Cyclosporin A Spiegel vorzuweisen [115, 135]. In den Verläufen von Patienten mit hohen Viruslasten, konnten wir zeigen, dass eine Senkung des CyA Spiegels zwar in einer temporären Reduktion der EBV Last resultiert, diese aber unter Umständen auch wieder ansteigen kann und sich wie oben beschrieben nicht bis zu Normalwerten absenken lässt. So würde auch weiterhin ein Risiko zu Entwicklung einer PTLD bestehen (siehe Abbildung 14 bis Abbildung 18) [136].

Ein wesentlicher Grund hierfür könnte in einer möglichen Interaktion durch begleitende Immunsuppressiva liegen und durch den Einfluss auf die B- und T-Zell Funktion erklärt werden [137]. Somit ist die Höhe der Immunsuppression in transplantierten Patienten durch die Bestimmung des Calcineurininhibitorspiegel allein nicht adäquat wiedergegeben und durch zusätzliche immunsuppressive Medikamente besteht ein weiteres und eventuell auch potenzierendes Risiko für eine maligne Erkrankung [115].

#### **4.5.4. Ergänzende Immunsuppressiva**

Bisher gibt es nur einige wenige Studien, die ergänzende Immunsuppressiva in Bezug auf Epstein-Barr Viruslast und PTLD Inzidenz miteinander vergleichen [40, 128, 129, 138-140]. Mycophenolat Mofetil (MMF) und Azathioprin (Aza) weisen als Antimetaboliten der Purinsynthese einen ähnlichen Wirkmechanismus auf, jedoch erscheint MMF das potentere Immunsuppressivum zu sein [139]. Trotzdem belegen mehrere Studien, dass die Inzidenz von Karzinomen und Lymphoproliferativen Erkrankungen bei Patienten die MMF erhalten, signifikant geringer ist, als bei Azathioprin [128, 129].

MMF scheint die Aktivität von Aciclovir gegen Herpesviren zu potenzieren [141]. Durch MMF allein und in Kombination mit einem Virustatikum konnte die Anzahl der EBV Infektionen signifikant gesenkt werden [142]. Bei uns zeigte sich keine Korrelation zwischen der Gabe von Virustatika und der EBV Last, weder bei MMF noch mit anderen Ergänzungsimmunosuppressiva im Regime.

Die verringerte Inzidenz von Lymphoproliferativen Erkrankungen unter MMF scheinen unsere Studienergebnisse zu bestätigen, denn auch bei uns zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Epstein-Barr Viruslast beim Vergleich von Patienten mit MMF oder Azathioprin (siehe Tabelle 8 und Abbildung 10)[115]. Dies wurde in der Multivariatanalyse noch einmal deutlich hervorgehoben, denn Patienten mit Azathioprin hatten im Vergleich zwar geringere CyA Spiegel als Patienten mit MMF, aber dennoch signifikant erhöhte Epstein-Barr Viruslasten. Pathogenetisch lässt sich ein eventuell positiver Effekt von Mycophenolat Mofetil auf die Lymphozytenfunktion vermuten [143]. Zusätzlich zeigt MMF im Vergleich zu den anderen Ergänzungsimmunosuppressiva neben einer geringer ausgeprägten T-Zell- auch eine B-Zell-Inhibition und eine Verminderung von Aktivitätsmarkern (CD25 und CD38) auf der Zelloberfläche [143, 144]. Nachweislich reduziert MMF die Gesamtzahl der B-Lymphozythen [144]. So bleibt es allerdings fraglich ob die erwiesene positive Wirkung von MMF auf die Epstein-Barr Persistenz und Replikation durch eine reduzierte T-Zell Inhibition entsteht oder möglicherweise auf eine Interferenz mit der virusinfizierten B-Zelle zurückzuführen ist.

Kurz nach der Einführung von m-TOR (Target of Rapamycin) Inhibitoren im Jahre 1999, wurden zwei Studien publiziert, die berichteten, dass Rapamycin nicht nur wirksam vor Abstoßung schützte, sondern auch Tumorprogression in Mäusen verhinderte [145, 146]. Es konnte außerdem bewiesen werden, dass Everolimus das Wachstum von PTLD Zellen in vitro und in vivo inhibiert und somit wirksam für die Prävention, wie auch Behandlung von PTLDs in transplantierten Patienten sein könnte [147].

Everolimus in Kombination mit Cyclosporin A zeigte in unserer Studie keinen Vorteil gegenüber MMF, jedoch entwickelte sich unter dieser Kombination nur eine PTLD im Vergleich zu fünf Fällen unter Azathioprin. Nach Umstellungen der Immunsuppression von Everolimus auf MMF konnte keine Senkung der EBV Last nachgewiesen werden. Jedoch ließ sich bei der Umstellung von Azathioprin auf Everolimus ein Abfall der EBV-Last im Verlauf von 12 Monaten beobachten [115]. Zu beweisen gilt, dass m-TOR Inhibitoren dem Patienten

einen besseren Schutz vor Abstoßungen und auch Tumorproliferation ermöglichen, dafür sind weitere Studien notwendig.

#### **4.5.5. Cytomegalie Virus Mismatch und Infektion**

In unserer Studie konnte kein Einfluss von CMV Mismatch oder Infektionen auf die Epstein-Barr Viruslast nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit einigen Autoren [35, 41, 55, 56]. Obwohl andere einen engen Zusammenhang zwischen einer CMV Infektion und der Entwicklung hoher EBV Lasten sahen [52-54].

Der Grund dafür könnte in den unterschiedlichen Protokollen der jeweiligen Transplantationszentren bezüglich Art und Dauer der antiviralen Therapien und auch unterschiedlicher Induktions- und Immunsuppressionsbehandlungen sein.

#### **4.5.6. Abstoßungen und deren Behandlung**

Abstoßung des transplantierten Herzens ist der Hauptgrund für erhöhte Morbidität und Mortalität im ersten Jahr nach Transplantation. Das akut inflammatorische Infiltrat resultiert in fibrinoider Nekrose der Gefäße des transplantierten Organs. Die zelluläre Abstoßung ist ein hauptsächlich T-Zell vermittelter Prozess, obwohl auch B-Zell Antworten ihren Anteil zu haben scheinen. Induktionstherapien wurden ursprünglich entwickelt um Toleranz gegenüber dem Transplantat zu entwickeln, was in dieser Form leider nicht umgesetzt werden konnte. Nichtsdestotrotz ist das Konzept der Induktion sinnvoll, weil die Anti-Donor Antworten am stärksten direkt nach der Transplantation auftreten, zumal unter anderem die Spender Antigenexpression kurz vor dem Versterben durch den Hirntod, Ischämie/Reperfusion und durch ein chirurgisches Trauma gesteigert wird. So ist der größte Vorteil der Induktionsbehandlung die signifikante Reduktion von Abstoßungen in der frühen und mittleren postoperativen Phase. Gleichwohl im weiteren Verlauf nach Transplantation die Immunsuppression aufrechterhalten wird, können gelegentlich akute oder chronische Abstoßungen auftreten. Die Intensität und Art der Abstoßungsbehandlung hängt dann von der Schwere, den hämodynamischen Folgen und der Art der Rejektion (T-Zell vermittelte oder humorale Rejektion) ab. Die Abstoßung wird dann mit einer Erhöhung oder Änderung der oralen immunsuppressiven Medikation, einer Stoßtherapie mit Methylprednisolon oder mono- oder polyklonalen Antithymozyten Antikörpern behandelt. Die Folge dieser erhöhten Immunsuppression ist ein vermehrtes Auftreten von Infektionen, bedingt durch die

Unterdrückung der immunologischen Kompetenz. Vor allem aber die Behandlung mit Antithymozyten Antikörpern scheint einen Risikofaktor für eine EBV-Reaktivierung darzustellen (siehe Kapitel 4.5.2) [115].

Sinnvoll erscheint es daher, Rejektionen durch effektive Immunsuppression zu verhindern, um so die mögliche Behandlung mit polyklonalen Antikörpern und die damit verbundene Intensivierung der Immunsuppression gering zu halten. So untersuchten wir die Inzidenz von akuten Rejektionen innerhalb der 96% des Gesamtkollektivs ausmachenden drei Gruppen: CyA-Azathioprin, CyA-MMF und CyA-Everolimus im ersten Jahr nach Transplantation.

Es traten mit jeweils durchschnittlich 1,4 Rejektionen pro Patient die meisten Abstoßungen bei den Kombinationen CyA-Aza und CyA-MMF auf. Patienten mit CyA-Aza wurden häufiger mit Antithymozyten Antikörpern (ATG) behandelt. CyA-MMF und CyA-Azathioprin zeigen also keinen signifikanten Unterschied was die Inzidenz von Rejektionen betrifft. Dies steht im Gegensatz zu Studien, welche MMF klar im Vorteil gegenüber Azathioprin sahen [141, 148]. CyA-Everolimus schneidet mit der geringsten Anzahl Abstoßungen signifikant besser ab (im Mittel 0,7 Rejektionen pro Patient) als CyA-MMF, was die bisherige Studienlage bestätigt [138]. Außerdem konnten wir nachweisen, dass nicht die Anzahl der Abstoßungen per se erhöhte Viruslasten verursachen, sondern deren Behandlung mit ATG den größeren Einfluss zu haben scheint (siehe Abbildung 12). Bei einem Grenzwert von 2000 Kopien/ $\mu$ g DNA hatten Patienten mit erhöhter EBV Last eine statistisch signifikant größere Anzahl Gaben ATG erhalten, unterschieden sich jedoch nicht in der Anzahl der Abstoßungen von den Patienten mit EBV Lasten unter 2000 Kopien/ $\mu$ g DNA.

In der multivariaten Analyse zeigte sich gerade kein Einfluss der Anzahl der Abstoßungen und der Gaben ATG mehr (siehe Tabelle 11) Bei der Gewichtung mehrerer Faktoren scheint das Alter, Geschlecht und vor allem das ergänzende Immunsuppressivum den stärkeren Einfluss auszumachen.

#### **4.6. Limitationen**

Diese Studie ist eine monozentrische Erhebungsstudie an herztransplantierten Kindern. Aufgrund limitierter Daten zum EBV Status vor Transplantation konnten wir nicht in allen Kindern zwischen Primärinfektion und Reaktivierung unterscheiden. Limitierungen dieser Studie ergeben sich zudem aus dem mit 75 Patienten relativ kleinen Patientenkollektiv und der teilweisen multiplen medikamentösen Therapie, den multiplen Begleitfaktoren und

Risiken. Jedoch konnten immerhin aus einem Kollektiv von über 150 herztransplantierten Kindern (Stand 2008) am DHZB nahezu 50% der Patienten eingeschlossen werden. Die Herztransplantationen der Kinder erstreckten sich über einen mittleren Zeitraum, so dass sich auch Unterschiede im Abstand der Nachuntersuchungen ergaben. In dem teilweise langen postoperativen Verlauf wurde bei einigen Patienten auch die Immunsuppression umgestellt, so dass die Vergleichbarkeit der de-novo und Maintenance Immunsuppression limitiert war. Für eine groß angelegte, prospektive klinische Studie mit größeren Patientenzahlen sind multizentrische Studien notwendig. Weil EBV Messungen jedoch noch nicht standardisiert sind, ist es schwierig solche durchzuführen.

#### **4.7. Schlussfolgerung**

Wir empfehlen bei Kindern nach Herztransplantation eine regelmäßige Untersuchung auf das Epstein-Barr Virus. Eine quantitative EBV-PCR im Vollblut sollte im Abstand von 1, 2, 3, 6, 12, 24 Monaten und danach jährlich postoperativ durchgeführt werden. Zusätzlich empfehlen wir regelmäßig den Lymphknotenstatus der Patienten zu untersuchen und auf Mononukleose ähnliche Symptome zu achten. Ferner ist eine individuelle und optimale Immunsuppression adaptiert für Alter und Risiko erforderlich, um so auf der einen Seite Abstoßungen und auf der anderen Seite Nebenwirkungen zu vermeiden. Möglicherweise bieten m-Tor Inhibitoren eine Möglichkeit zur Reduktion beider Risiken.

Bei Patienten mit einer Viruslast von über 2000 beziehungsweise 3000 Kopien/ $\mu$ g DNA sollten engmaschige Untersuchungen der EBV Last und klinische Untersuchungen zum Ausschluss einer PTLD durchgeführt werden. Diese beinhalten HNO-Status, Lymphknoten-Status und eine Augenuntersuchung. Ein Thorax Röntgen sollte wenigstens einmal erfolgen. Um eine okkulte oder manifeste PTLD auszuschließen kann man bei Verdacht ein PET-CT, ein CT des Thorax und des Kopfes oder ein MRT des Kopfes durchführen. Im Falle erhöhter EBV Lasten empfehlen wir ergänzende Labortests durchzuführen: LDH, Nieren- und Leberfunktion, Calcium, Phosphat, Harnsäure und Immunglobuline[115]. Die Diagnosesicherung erfolgt histologisch, immunhistologisch und durch molekularpathologische Untersuchungen. Ein Absenken der Immunsuppression ist unumgänglich. Eventuell. liegt aber auch ein erhebliches Potential in der Änderung und Umstellung der Immunsuppression.

#### **4.8. Ausblick**

Um die Limitationen einer monozentrischen Studie zu umgehen, sollten in Zukunft multizentrische, randomisierte Studien angestrebt werden. Dafür wird es notwendig sein eine gemeinsame Methode und einen gemeinsamen Standard in der EBV Last Bestimmung zu finden. Nur so würde es möglich werden, prospektive, randomisierte Studien durchzuführen und genügend Patientenzahlen für optimale Beurteilung des Einflusses der Immunsuppression zu erreichen. Hinzukommend wäre es aufschlussreich die Immunsuppression in jedem einzelnen Patienten mit Spiegel und der Lymphozytenanzahl beziehungsweise der gegen EBV gerichteten Lymphozytenfunktion (EBV-Elispot) zu untersuchen. Des Weiteren sollten tierexperimentelle Studien genau die Auswirkungen der einzelnen immunsuppressiven Medikamente auf das Immunsystem und Wechselbeziehungen zu der Epstein-Barr Virusinfektion prüfen.

Auf lange Sicht wird es auf diese Weise möglich sein, das Langzeitüberleben pädiatrischer Patienten nach Herztransplantation durch optimalere und angepasste Immunsuppression weiter zu verbessern.

## 5. Zusammenfassung

**Hintergrund:** Die Herztransplantation ist eine etablierte Therapie zur Behandlung der terminalen Herzinsuffizienz im Kindesalter. Im Langzeitverlauf nach Transplantation spielen die akute und chronische Abstoßung, das chronische Graftversagen und Tumorerkrankungen eine wesentliche Rolle und bestimmen die Morbidität und Mortalität. Virale Infektionen und Reaktivierungen spielen vor allem im Kindes- und Jugendalter eine entscheidende Rolle und sind durch eine inadäquate immunologische Antwort aufgrund der bestehenden Immunsuppression erklärbar. Durch Infektion oder Reaktivierung des Epstein-Barr Virus, unter T-Zell Depletion im Rahmen der Immunsuppression, existiert ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Posttransplant-lymphoproliferativen Erkrankung (PTLD).

**Methode:** In 75 von über 150 herztransplantierten Kindern am DHZB wurden von 01/2003 bis 5/2007 die Epstein-Barr Viruslast und die aktuelle Immunsuppression bestimmt. Die EBV Last Bestimmung erfolgte mittels real-time PCR im Vollblut.

**Ergebnisse:** Es konnten neue Risikofaktoren für eine erhöhte EBV Last und somit für die Entwicklung einer PTLD aufgezeigt werden. Patienten mit einer EBV-Last von über 2000 Kopien/ $\mu$ g DNA zeigten ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer PTLD (Sensitivität 100%, Spezifität 81%,  $p=0,001$ ). Ein geringes Alter und ein negativer EBV-Serostatus bei Transplantation stellen zwei Hauptrisikofakten für eine PTLD dar. Kinder unter 10 Jahren hatten ein signifikant erhöhtes Risiko hohe Epstein-Barr Viruslasten nach Transplantation zu entwickeln. Einen signifikanten Unterschied bezüglich der EBV-Replikation ergab sich auch durch den Antimetaboliten: Patienten mit CyA-MMF hatten signifikant niedrigere EBV-Lasten als Patienten mit CyA-Azathioprin, unabhängig vom CyA-Spiegel. Zusätzlich zeigte sich eine Abhängigkeit von der Anzahl der Gaben des Antithymozyten Antikörper (ATG): bei mehr als 3 Gaben stieg auch das Risiko für eine erhöhte Epstein-Barr Viruslast, wobei die Anzahl der Abstoßungen per se keinen Einfluss auf die Viruslast hatte. Die Art des Calcineurininhibitors (Cyclosporin A oder Tacrolimus) und der Cyclosporin A Spiegel im Blut hat ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Epstein-Barr Viruslast.

**Schlussfolgerung:** Die Bestimmung der Epstein-Barr Viruslast bei Kindern nach Herztransplantation sollte regelmäßig erfolgen. Eine EBV-Last von über 2000 Kopien/ $\mu$ g DNA stellt ein erhöhtes Risiko für eine PTLD dar. T-Zell depletierenden Medikamente (ATG) sollten vermieden werden, die Immunsuppression sollte optimal an die Risikofaktoren der Kinder angepasst werden. Bei Kindern unter zehn Jahren und Patienten mit einem erhöhten Risiko für eine PTLD sollten Azathioprin und Antithymozyten Antikörpern

vermieden und gegebenenfalls MMF und m-TOR-Inhibitoren eingesetzt werden. Möglicherweise stellen m-Tor Inhibitoren in Zukunft eine Therapiealternative bei Patienten mit Risiko für eine PTLD dar.

## 6. Abstract

**Background:** Heart transplantation has been established for the treatment of pediatric patients with terminal heart failure. Acute and chronic rejection, graft failure and malignancy influence morbidity and mortality in the long-term follow-up. The Epstein-Barr virus (EBV) infection or persistence in B-cells may result in posttransplant lymphoproliferative disease (PTLD), affecting the long-term survival of pediatric heart transplant patients. High grade EBV replication from infection or reactivation may be explained by T-cell depletion under immunosuppression and may lead to EBV related B-cell proliferation and PTLD. **Method:** We monitored 75 out of 150 pediatric patients who received heart transplantation at the Deutsches Herzzentrum Berlin between 01/2003 and 05/2007 in terms of EBV load, immunosuppression and incidence of PTLD. EBV load was measured using quantitative real-time PCR. **Results:** Patients with an EBV load of above 2000 copies/ $\mu$ g DNA were at risk for the development of PTLD (sensitivity 100%, specificity 81%, positive predictive value 31%, AUC 0.91;  $p=0.001$ ). The main risk factor for high-grade EBV replication and development of PTLD were age and negative EBV status at time of transplantation. Children below ten years of age at time of transplantation had a significantly increased risk for the development of an increased EBV load. Other risk factors for an increased EBV load were more than three doses of antithymocyte globulin (ATG) and CsA/azathioprine. Significantly lower or negative EBV loads were measured in patients with CsA/mycophenolate mofetil. CsA blood levels were not predictable for increased EBV load in any group (Aza, Evrolimus or MMF). **Conclusions:** Frequent EBV load monitoring identifies patients at risk for the development of PTLD. As the main risk factors for an increased EBV load and PTLD are azathioprine and ATG. Patients may benefit from a change in their immunosuppression, whereby MMF and mTOR-inhibitors may be beneficial.

## 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Todesursachenstatistik der ISHLT 2006 .....	8
Tabelle 2: Histologische Klassifikation der PTLD (WHO).....	9
Tabelle 3: Einfluss von CMV Mismatch und Infektion nach Transplantation, EBV Status vor Tx und Geschlecht auf die EBV Last.....	26
Tabelle 4: Anzahl Gaben ATG und EBV Last.....	28
Tabelle 5: Demographische Daten der Gruppe CyA-Azathioprin.....	34
Tabelle 6: Demographische Daten der Gruppe CyA-MMF.....	35
Tabelle 7: Demographische Daten der Gruppe CyA-Everolimus.....	36
Tabelle 8: Vergleich der EBV Last: Immunsuppressive Kombinationen.....	37
Tabelle 9: Vergleich der Inzidenz von Abstoßungen verschiedener immunsuppressiver Kombinationen im ersten Jahr nach HTX.....	39
Tabelle 10: Abstoßungen nach dem ersten Jahr nach Herztransplantation.....	39
Tabelle 11: Logistische Regression der Einflussfaktoren auf die EBV Last.....	42
Tabelle 12: Klinische Charakteristika bei Patienten mit PTLD.....	43
Tabelle 13: Evaluierung des Tests der EBV Last Bestimmung bezüglich der Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer PTLD .....	44
Tabelle 14: Demographische Daten der Patienten mit Verlaufsbeobachtung.....	45

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überleben für pädiatrische Patienten nach Herztransplantation .....	7
Abbildung 2: Latente und Lytische Phase des Epstein-Barr Virus .....	16
Abbildung 3: Vereinfachtes Modell zur Pathogenese einer Posttransplant-Lymphoproliferative Disease .....	18
Abbildung 4: Die EBV Last (Kopien/ $\mu$ g DNA) in Abhängigkeit des Alters bei Transplantation.....	27
Abbildung 5: EBV Last in Abhängigkeit der Art des Calcineurininhibitors .....	29
Abbildung 6: Der Calcineurininhibitorspiegel in Abhängigkeit von der EBV Last .....	30
Abbildung 7: Höhe des Cyclosporin A Spiegels in Abhängigkeit von der Kombination mit dem zweiten Immunsuppressivum .....	31
Abbildung 8: Cyclosporin A Spiegel in Abhängigkeit von der EBV Last .....	32
Abbildung 9: A Immunsuppression nach Transplantation, B Immunsuppression zum Zeitpunkt des EBV Screenings .....	33
Abbildung 10: Vergleich der Epstein-Barr Viruslasten zwischen den häufigsten immunsuppressiven Kombinationen .....	38
Abbildung 11: Epstein-Barr Viruslast in Zusammenhang mit der Anzahl der Abstoßungen..	40
Abbildung 12: Anzahl der Abstoßungen und Anzahl der Gaben ATG in Abhängigkeit von der EBV Last.....	41
Abbildung 13: Vergleich der Epstein-Barr Viruslast in Patienten mit und ohne PTLD .....	43
Abbildung 14: Verlauf der EBV Last und Cyclosporin A Spiegel von Patient 1 .....	45
Abbildung 15: Verlauf der EBV Last und Cyclosporin A Spiegel von Patient 2 .....	46
Abbildung 16: Verlauf der EBV Last und Cyclosporin A Spiegel von Patient 3 .....	46
Abbildung 17: Verlauf der EBV Last und Cyclosporin A Spiegel von Patient 4 .....	47
Abbildung 18: Verlauf der EBV Last und Cyclosporin A Spiegel von Patient 5 .....	47

## 9. Abkürzungsverzeichnis

ATG	Antithymozyten Antikörper
Aza	Azathioprin
BZLF-1	Gen für Z-Transaktivator oder Z-Transaktivator
CMV	Cytomegalie Virus
CyA	Cyclosporin A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBER	“Epstein-Barr Virus encoded small RNAs”
EBNA	„Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen“
EBV	Epstein-Barr Virus
ELISPOT	„Enzyme linked Immunospot“
ELISA	„Enzyme linked immunosorbent assay“
Eve	Everolimus
FK506	Tacrolimus
HTx	Herztransplantation
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
ISHLT	“International Society for Heart and Lung Transplantation”
LMP	Latentes Membran Protein
LP	„Leader Protein“
MHC	„Major Histocompatibility Complex“
MMF	Mycophenolat Mofetil
OKT3	Muromonab (Orthoclone)
PBMC	Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
PTLD	Posttransplant-Lymphoproliferative Disease
Tac	Tacrolimus
TGF	„Tumor Growth Factor“
TNF	„Tumor Necrosis Factor“
TVP	Transplantatvaskulopathie
Tx	Transplantation
VCA	Viruskapsid Antigen
WHO	„World Health Organisation“

## 10. Literaturverzeichnis

1. Bailey L, J.J., *Infant heart transplantation Protocol*. Loma Linda University Medical Center, 1985.
2. Waltz, D.A., et al., *Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: ninth official pediatric lung and heart-lung transplantation report--2006*. J Heart Lung Transplant, 2006. **25**(8): p. 904-11.
3. Doak, P.B., et al., *Reticulum cell sarcoma after renal homotransplantation and azathioprine and prednisone therapy*. Br Med J, 1968. **4**(5633): p. 746-8.
4. Starzl, T.E., et al., *Reversibility of lymphomas and lymphoproliferative lesions developing under cyclosporin-steroid therapy*. Lancet, 1984. **1**(8377): p. 583-7.
5. Trofe, J., et al., *Analysis of factors that influence survival with post-transplant lymphoproliferative disorder in renal transplant recipients: the Israel Penn International Transplant Tumor Registry experience*. Am J Transplant, 2005. **5**(4 Pt 1): p. 775-80.
6. Halkos, M.E., et al., *Thoracic presentations of posttransplant lymphoproliferative disorders*. Chest, 2004. **126**(6): p. 2013-20.
7. Cao, S., et al., *Posttransplant lymphoproliferative disorders and gastrointestinal manifestations of Epstein-Barr virus infection in children following liver transplantation*. Transplantation, 1998. **66**(7): p. 851-6.
8. Dharnidharka, V.R., et al., *Risk factors for posttransplant lymphoproliferative disorder (PTLD) in pediatric kidney transplantation: a report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study (NAPRTCS)*. Transplantation, 2001. **71**(8): p. 1065-8.
9. Cohen, A.H., et al., *High incidence of posttransplant lymphoproliferative disease in pediatric patients with cystic fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(4 Pt 1): p. 1252-5.
10. Nalesnik, M.A., et al., *The pathology of posttransplant lymphoproliferative disorders occurring in the setting of cyclosporine A-prednisone immunosuppression*. Am J Pathol, 1988. **133**(1): p. 173-92.
11. Harris NL, S.S., Frizzera G, Knowles DM, *Post-transplant lymphoproliferative disorders*. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2001, Lyon, France: IARC Press. 264-269.
12. Semakula, B., J.V. Rittenbach, and J. Wang, *Hodgkin lymphoma-like posttransplantation lymphoproliferative disorder*. Arch Pathol Lab Med, 2006. **130**(4): p. 558-60.
13. Kroes, A.C., et al., *Rapid occurrence of lymphoproliferative disease after pancreas-kidney transplantation performed during acute primary Epstein-Barr virus infection*. Clin Infect Dis, 1997. **24**(3): p. 339-43.
14. Webber, S.A., et al., *Lymphoproliferative disorders after paediatric heart transplantation: a multi-institutional study*. Lancet, 2006. **367**(9506): p. 233-9.
15. Leblond, V., et al., *Posttransplant lymphoproliferative disorders not associated with Epstein-Barr virus: a distinct entity?* J Clin Oncol, 1998. **16**(6): p. 2052-9.
16. Swinnen, L.J., et al., *Increased incidence of lymphoproliferative disorder after immunosuppression with the monoclonal antibody OKT3 in cardiac-transplant recipients*. N Engl J Med, 1990. **323**(25): p. 1723-8.
17. Brumbaugh, J., et al., *Quantitative analysis of immunosuppression in cyclosporine-treated heart transplant patients with lymphoma*. J Heart Transplant, 1985. **4**(3): p. 307-11.

18. Aull, M.J., et al., *Experience with 274 cardiac transplant recipients with posttransplant lymphoproliferative disorder: a report from the Israel Penn International Transplant Tumor Registry*. *Transplantation*, 2004. **78**(11): p. 1676-82.
19. Armitage, J.M., et al., *Posttransplant lymphoproliferative disease in thoracic organ transplant patients: ten years of cyclosporine-based immunosuppression*. *J Heart Lung Transplant*, 1991. **10**(6): p. 877-86; discussion 886-7.
20. Zangwill, S.D., et al., *Incidence and outcome of primary Epstein-Barr virus infection and lymphoproliferative disease in pediatric heart transplant recipients*. *J Heart Lung Transplant*, 1998. **17**(12): p. 1161-6.
21. Anderson, J.L., et al., *Idiopathic cardiomyopathy, age, and suppressor-cell dysfunction as risk determinants of lymphoma after cardiac transplantation*. *Lancet*, 1978. **2**(8101): p. 1174-7.
22. Bakker, N.A., et al., *Early onset post-transplant lymphoproliferative disease is associated with allograft localization*. *Clin Transplant*, 2005. **19**(3): p. 327-34.
23. Paranjothi, S., et al., *Lymphoproliferative disease after lung transplantation: comparison of presentation and outcome of early and late cases*. *J Heart Lung Transplant*, 2001. **20**(10): p. 1054-63.
24. Wilde, G.E., D.J. Moore, and R.D. Bellah, *Posttransplantation lymphoproliferative disorder in pediatric recipients of solid organ transplants: timing and location of disease*. *AJR Am J Roentgenol*, 2005. **185**(5): p. 1335-41.
25. Godyn, J.J., et al., *Demonstration of passenger leukocytes in a case of Epstein-Barr virus posttransplant lymphoproliferative disorder using restriction fragment length polymorphism analysis*. *Arch Pathol Lab Med*, 1992. **116**(3): p. 249-52.
26. Petit, B., et al., *Influence of host-recipient origin on clinical aspects of posttransplantation lymphoproliferative disorders in kidney transplantation*. *Transplantation*, 2002. **73**(2): p. 265-71.
27. Randhawa, P.S. and S.A. Yousem, *Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease in a heart-lung allograft. Demonstration of host origin by restriction fragment-length polymorphism analysis*. *Transplantation*, 1990. **49**(1): p. 126-30.
28. Chadburn, A., et al., *Post-transplantation lymphoproliferative disorders arising in solid organ transplant recipients are usually of recipient origin*. *Am J Pathol*, 1995. **147**(6): p. 1862-70.
29. Kawa, K., *Epstein-Barr virus--associated diseases in humans*. *Int J Hematol*, 2000. **71**(2): p. 108-17.
30. Baumforth, K.R., et al., *The Epstein-Barr virus and its association with human cancers*. *Mol Pathol*, 1999. **52**(6): p. 307-22.
31. Rea, D., et al., *Patterns of Epstein-Barr virus latent and replicative gene expression in Epstein-Barr virus B cell lymphoproliferative disorders after organ transplantation*. *Transplantation*, 1994. **58**(3): p. 317-24.
32. Montone, K.T., et al., *Identification of Epstein-Barr virus lytic activity in post-transplantation lymphoproliferative disease*. *Mod Pathol*, 1996. **9**(6): p. 621-30.
33. Young, L., et al., *Expression of Epstein-Barr virus transformation-associated genes in tissues of patients with EBV lymphoproliferative disease*. *N Engl J Med*, 1989. **321**(16): p. 1080-5.
34. Walker, R.C., et al., *Pretransplantation seronegative Epstein-Barr virus status is the primary risk factor for posttransplantation lymphoproliferative disorder in adult heart, lung, and other solid organ transplantations*. *J Heart Lung Transplant*, 1995. **14**(2): p. 214-21.
35. Shahinian, V.B., et al., *Epstein-Barr virus seronegativity is a risk factor for late-onset posttransplant lymphoproliferative disorder in adult renal allograft recipients*. *Transplantation*, 2003. **75**(6): p. 851-6.

36. Khanna, R., D.J. Moss, and S.R. Burrows, *Vaccine strategies against Epstein-Barr virus-associated diseases: lessons from studies on cytotoxic T-cell-mediated immune regulation*. Immunol Rev, 1999. **170**: p. 49-64.
37. Duraiswamy, J., et al., *Therapeutic LMP1 polyepitope vaccine for EBV-associated Hodgkin disease and nasopharyngeal carcinoma*. Blood, 2003. **101**(8): p. 3150-6.
38. Bustami, R.T., et al., *Immunosuppression and the risk of post-transplant malignancy among cadaveric first kidney transplant recipients*. Am J Transplant, 2004. **4**(1): p. 87-93.
39. Duvoux, C., et al., *Risk factors for lymphoproliferative disorders after liver transplantation in adults: an analysis of 480 patients*. Transplantation, 2002. **74**(8): p. 1103-9.
40. Opelz, G. and B. Dohler, *Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report*. Am J Transplant, 2004. **4**(2): p. 222-30.
41. Caillard, S., et al., *Posttransplant lymphoproliferative disorders after renal transplantation in the United States in era of modern immunosuppression*. Transplantation, 2005. **80**(9): p. 1233-43.
42. Sokal, E.M., et al., *Early signs and risk factors for the increased incidence of Epstein-Barr virus-related posttransplant lymphoproliferative diseases in pediatric liver transplant recipients treated with tacrolimus*. Transplantation, 1997. **64**(10): p. 1438-42.
43. Pirsch, J.D., *Cytomegalovirus infection and posttransplant lymphoproliferative disease in renal transplant recipients: results of the U.S. multicenter FK506 Kidney Transplant Study Group*. Transplantation, 1999. **68**(8): p. 1203-5.
44. Dharnidharka, V.R., et al., *Mycophenolate, tacrolimus and post-transplant lymphoproliferative disorder: a report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study*. Pediatr Transplant, 2002. **6**(5): p. 396-9.
45. Dharnidharka, V.R., *Post-transplant lymphoproliferative disease: association with induction therapy?* Drugs, 2006. **66**(4): p. 429-38.
46. Tanner, J.E. and C. Alfieri, *Interactions involving cyclosporine A, interleukin-6, and Epstein-Barr virus lead to the promotion of B-cell lymphoproliferative disease*. Leuk Lymphoma, 1996. **21**(5-6): p. 379-90.
47. Nepomuceno, R.R., et al., *Rapamycin inhibits the interleukin 10 signal transduction pathway and the growth of Epstein Barr virus B-cell lymphomas*. Cancer Res, 2003. **63**(15): p. 4472-80.
48. Orii, T., et al., *Decreasing the Epstein-Barr virus load by adjusting the FK506 blood level*. Transpl Int, 2002. **15**(11): p. 529-34.
49. Lamy, M.E., et al., *Epstein-Barr virus infection in 59 orthotopic liver transplant patients*. Med Microbiol Immunol (Berl), 1990. **179**(3): p. 137-44.
50. Nalesnik, M.A., *Clinicopathologic features of posttransplant lymphoproliferative disorders*. Ann Transplant, 1997. **2**(4): p. 33-40.
51. Aalto, S.M., et al., *Immunoreactivation of Epstein-Barr virus due to cytomegalovirus primary infection*. J Med Virol, 1998. **56**(3): p. 186-91.
52. Walker, R.C., et al., *Pretransplantation assessment of the risk of lymphoproliferative disorder*. Clin Infect Dis, 1995. **20**(5): p. 1346-53.
53. Manez, R., et al., *Factors associated with the development of post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD) in Epstein-Barr virus (EBV)-seronegative adult liver transplant recipients*. Transpl Int, 1994. **7 Suppl 1**: p. S235-7.
54. Manez, R., et al., *Posttransplant lymphoproliferative disease in primary Epstein-Barr virus infection after liver transplantation: the role of cytomegalovirus disease*. J Infect Dis, 1997. **176**(6): p. 1462-7.

55. Funch, D.P., et al., *Ganciclovir and acyclovir reduce the risk of post-transplant lymphoproliferative disorder in renal transplant recipients*. Am J Transplant, 2005. **5**(12): p. 2894-900.
56. Gao, S.Z., et al., *Post-transplantation lymphoproliferative disease in heart and heart-lung transplant recipients: 30-year experience at Stanford University*. J Heart Lung Transplant, 2003. **22**(5): p. 505-14.
57. Merlino, C., et al., *Quantitative PCR in EBV-infected renal transplant patients*. New Microbiol, 2001. **24**(3): p. 223-9.
58. Stevens, S.J., et al., *Frequent monitoring of Epstein-Barr virus DNA load in unfractionated whole blood is essential for early detection of posttransplant lymphoproliferative disease in high-risk patients*. Blood, 2001. **97**(5): p. 1165-71.
59. Orentas, R.J., et al., *Monitoring and modulation of Epstein-Barr virus loads in pediatric transplant patients*. Pediatr Transplant, 2003. **7**(4): p. 305-14.
60. Kogan-Liberman, D., et al., *The role of quantitative Epstein-Barr virus polymerase chain reaction and preemptive immunosuppression reduction in pediatric liver transplantation: a preliminary experience*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2001. **33**(4): p. 445-9.
61. Scheenstra, R., et al., *The value of prospective monitoring of Epstein-Barr virus DNA in blood samples of pediatric liver transplant recipients*. Transpl Infect Dis, 2004. **6**(1): p. 15-22.
62. Benden, C., et al., *Monitoring of Epstein-Barr viral load in pediatric heart and lung transplant recipients by real-time polymerase chain reaction*. J Heart Lung Transplant, 2005. **24**(12): p. 2103-8.
63. Ferry, J.A., et al., *Lymphoproliferative disorders and hematologic malignancies following organ transplantation*. Mod Pathol, 1989. **2**(6): p. 583-92.
64. Harris, N.L., J.A. Ferry, and S.H. Swerdlow, *Posttransplant lymphoproliferative disorders: summary of Society for Hematopathology Workshop*. Semin Diagn Pathol, 1997. **14**(1): p. 8-14.
65. Hsi, E.D., M.M. Picken, and S. Alkan, *Post-transplantation lymphoproliferative disorder of the NK-cell type: a case report and review of the literature*. Mod Pathol, 1998. **11**(5): p. 479-84.
66. Kemnitz, J., et al., *T-cell lymphoma after heart transplantation*. Am J Clin Pathol, 1990. **94**(1): p. 95-101.
67. Randhawa, P.S., et al., *Expression of Epstein-Barr virus-encoded small RNA (by the EBV-1 gene) in liver specimens from transplant recipients with post-transplantation lymphoproliferative disease*. N Engl J Med, 1992. **327**(24): p. 1710-4.
68. Nelson, B.P., et al., *Epstein-Barr virus-negative post-transplant lymphoproliferative disorders: a distinct entity?* Am J Surg Pathol, 2000. **24**(3): p. 375-85.
69. Burkitt, D.P., *The discovery of Burkitt's lymphoma*. Cancer, 1983. **51**(10): p. 1777-86.
70. Epstein, M.A., B.G. Achong, and Y.M. Barr, *Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma*. Lancet, 1964. **15**: p. 702-3.
71. Gunven, P., et al., *Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. Antibodies to EBV associated membrane and viral capsid antigens in Burkitt lymphoma patients*. Nature, 1970. **228**(5276): p. 1053-6.
72. Henle, W. and G. Henle, *The sero-epidemiology of Epstein-Barr virus*. Adv Pathobiol, 1976(5): p. 5-17.
73. Joncas, J., et al., *Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood*. Can Med Assoc J, 1974. **110**(1): p. 33-7.
74. Niederman, J.C., et al., *Infectious mononucleosis. Clinical manifestations in relation to EB virus antibodies*. Jama, 1968. **203**(3): p. 205-9.

75. Classen M., D.V., Kochsiek K., *Innere Medizin*. Vol. 5. 2004, München, Jena: Urban & Fischer. 868-869.
76. Sixbey, J.W., et al., *Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells*. N Engl J Med, 1984. **310**(19): p. 1225-30.
77. Niedobitek, G., et al., *Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells*. J Pathol, 1997. **182**(2): p. 151-9.
78. Nemerow, G.R., et al., *Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d*. J Virol, 1987. **61**(5): p. 1416-20.
79. Hislop, A.D., et al., *Epitope-specific evolution of human CD8(+) T cell responses from primary to persistent phases of Epstein-Barr virus infection*. J Exp Med, 2002. **195**(7): p. 893-905.
80. Hislop, A.D., et al., *EBV-specific CD8+ T cell memory: relationships between epitope specificity, cell phenotype, and immediate effector function*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 2019-29.
81. Callan, M.F., et al., *Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo*. J Exp Med, 1998. **187**(9): p. 1395-402.
82. Hoshino, Y., et al., *Antigen-driven expansion and contraction of CD8+-activated T cells in primary EBV infection*. J Immunol, 1999. **163**(10): p. 5735-40.
83. Callan, M.F., et al., *CD8(+) T-cell selection, function, and death in the primary immune response in vivo*. J Clin Invest, 2000. **106**(10): p. 1251-61.
84. Maini, M.K., et al., *Clonal expansions in acute EBV infection are detectable in the CD8 and not the CD4 subset and persist with a variable CD45 phenotype*. J Immunol, 2000. **165**(10): p. 5729-37.
85. Bickham, K., et al., *EBNA1-specific CD4+ T cells in healthy carriers of Epstein-Barr virus are primarily Th1 in function*. J Clin Invest, 2001. **107**(1): p. 121-30.
86. Miyashita, E.M., et al., *A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo*. Cell, 1995. **80**(4): p. 593-601.
87. Young, L.S. and A.B. Rickinson, *Epstein-Barr virus: 40 years on*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(10): p. 757-68.
88. Kieff, E., Rickinson, A.B., *Fields Virology*. 2001, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2511-2627.
89. Amon, W. and P.J. Farrell, *Reactivation of Epstein-Barr virus from latency*. Rev Med Virol, 2005. **15**(3): p. 149-56.
90. Tierney, R.J., et al., *Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state*. J Virol, 1994. **68**(11): p. 7374-85.
91. Sample, J., et al., *Restricted Epstein-Barr virus protein expression in Burkitt lymphoma is due to a different Epstein-Barr nuclear antigen 1 transcriptional initiation site*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(14): p. 6343-7.
92. Magrath, I., *The pathogenesis of Burkitt's lymphoma*. Adv Cancer Res, 1990. **55**: p. 133-270.
93. Brooks, L., et al., *Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 transcripts*. J Virol, 1992. **66**(5): p. 2689-97.
94. Dawson, C.W., A.B. Rickinson, and L.S. Young, *Epstein-Barr virus latent membrane protein inhibits human epithelial cell differentiation*. Nature, 1990. **344**(6268): p. 777-80.

95. Nicholson, L.J., et al., *Epstein-Barr virus latent membrane protein does not inhibit differentiation and induces tumorigenicity of human epithelial cells*. *Oncogene*, 1997. **15**(3): p. 275-83.
96. Deacon, E.M., et al., *Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells*. *J Exp Med*, 1993. **177**(2): p. 339-49.
97. Kerr, B.M., et al., *Three transcriptionally distinct forms of Epstein-Barr virus latency in somatic cell hybrids: cell phenotype dependence of virus promoter usage*. *Virology*, 1992. **187**(1): p. 189-201.
98. Benkerrou, M., A. Durandy, and A. Fischer, *Therapy for transplant-related lymphoproliferative diseases*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1993. **7**(2): p. 467-75.
99. Bhatia, S., et al., *Malignant neoplasms following bone marrow transplantation*. *Blood*, 1996. **87**(9): p. 3633-9.
100. Qu, L. and D.T. Rowe, *Epstein-Barr virus latent gene expression in uncultured peripheral blood lymphocytes*. *J Virol*, 1992. **66**(6): p. 3715-24.
101. Levitskaya, J., et al., *Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1*. *Nature*, 1995. **375**(6533): p. 685-8.
102. Faulkner, G.C., A.S. Krajewski, and D.H. Crawford, *The ins and outs of EBV infection*. *Trends Microbiol*, 2000. **8**(4): p. 185-9.
103. Rooney, C.M., et al., *The spliced BZLF1 gene of Epstein-Barr virus (EBV) transactivates an early EBV promoter and induces the virus productive cycle*. *J Virol*, 1989. **63**(7): p. 3109-16.
104. Crawford, D.H., et al., *Long-term T-cell-mediated immunity to Epstein-Barr virus in renal-allograft recipients receiving cyclosporin A*. *Lancet*, 1981. **1**(8210): p. 10-2.
105. Ragona, G., et al., *Evidence for dysregulation in the control of Epstein-Barr virus latency in patients with AIDS-related complex*. *Clin Exp Immunol*, 1986. **66**(1): p. 17-24.
106. Strauch, B., et al., *Oropharyngeal excretion of Epstein-Barr virus by renal transplant recipients and other patients treated with immunosuppressive drugs*. *Lancet*, 1974. **1**(7851): p. 234-7.
107. Yao, Q.Y., et al., *In vitro analysis of the Epstein-Barr virus: host balance in long-term renal allograft recipients*. *Int J Cancer*, 1985. **35**(1): p. 43-9.
108. Lam, K.M., et al., *Circulating Epstein-Barr virus-carrying B cells in acute malaria*. *Lancet*, 1991. **337**(8746): p. 876-8.
109. Babcock, G.J., et al., *Epstein-barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients*. *J Exp Med*, 1999. **190**(4): p. 567-76.
110. Trappe, R., S. Oertel, and H. Riess, *Pathogenese, Klinik, Diagnostik und Therapie transplantationsassoziiierter lymphoproliferativer Erkrankungen*. *Deutsches Ärzteblatt*, 2006. **103**(48): p. 3259-67.
111. Penn, I., *De novo malignancies in pediatric organ transplant recipients*. *Pediatr Transplant*, 1998. **2**(1): p. 56-63.
112. Boucek, M.M., et al., *The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Fourth Official Pediatric Report--2000*. *J Heart Lung Transplant*, 2001. **20**(1): p. 39-52.
113. Goss, J.A., et al., *Long-term results of pediatric liver transplantation: an analysis of 569 transplants*. *Ann Surg*, 1998. **228**(3): p. 411-20.
114. Sigfusson, G., et al., *Long-term survivors of pediatric heart transplantation: a multicenter report of sixty-eight children who have survived longer than five years*. *J Pediatr*, 1997. **130**(6): p. 862-71.

115. Schubert, S., et al., *Relationship of immunosuppression to Epstein-Barr viral load and lymphoproliferative disease in pediatric heart transplant patients*. J Heart Lung Transplant, 2008. **27**(1): p. 100-5.
116. Baldanti, F., et al., *High levels of Epstein-Barr virus DNA in blood of solid-organ transplant recipients and their value in predicting posttransplant lymphoproliferative disorders*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(2): p. 613-9.
117. Lucas, K.G., et al., *Semiquantitative Epstein-Barr virus (EBV) polymerase chain reaction for the determination of patients at risk for EBV-induced lymphoproliferative disease after stem cell transplantation*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3654-61.
118. Riddler, S.A., M.C. Breinig, and J.L. McKnight, *Increased levels of circulating Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocytes and decreased EBV nuclear antigen antibody responses are associated with the development of posttransplant lymphoproliferative disease in solid-organ transplant recipients*. Blood, 1994. **84**(3): p. 972-84.
119. Rowe, D.T., et al., *Use of quantitative competitive PCR to measure Epstein-Barr virus genome load in the peripheral blood of pediatric transplant patients with lymphoproliferative disorders*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(6): p. 1612-5.
120. Wagner, H.J., et al., *Patients at risk for development of posttransplant lymphoproliferative disorder: plasma versus peripheral blood mononuclear cells as material for quantification of Epstein-Barr viral load by using real-time quantitative polymerase chain reaction*. Transplantation, 2001. **72**(6): p. 1012-1019.
121. Green, M., T.V. Cacciarelli, and G. Mazariegos, *Serial measurement of EBV viral load in peripheral blood in pediatric liver transplant recipients during treatment for posttransplant lymphoproliferative disease*. Transplantation, 1998. **66**: p. 1641-1644.
122. Savoldo, B., et al., *Treatment of solid organ transplant recipients with autologous Epstein Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs)*. Blood, 2006. **108**(9): p. 2942-9.
123. Newell, K.A., et al., *Posttransplant lymphoproliferative disease in pediatric liver transplantation. Interplay between primary Epstein-Barr virus infection and immunosuppression*. Transplantation, 1996. **62**(3): p. 370-5.
124. Han CW, I.M., Hashino S, *Differential effects of the immunosuppressants cyclosporine A, FK506 and KM2210 on cytokine gene expression*. Bone Marrow Transplant, 1995. **15**: p. 733-739.
125. Beatty PR; Krams SM, E.C., Martinez OM, *Effect of cyclosporine and tacrolimus on the growth of Epstein-Barr virus-transformed B-cell lines*. Transplantation, 1998. **65**: p. 1248-1255.
126. Khanna A, C.V., Hosenpud JD, *Tacrolimus induces increased expression of transforming growth factor-beta1 in mammalian lymphoid as well as nonlymphoid cells*. Transplantation, 1999. **67**: p. 614-619.
127. Hojo, M., Morimoto T, Maluccio M, *Cyclosporine induces cancer progression by cell-autonomous mechanism*. Nature, 1999. **397**: p. 530-534.
128. Cherikh, W.S., et al., *Association of the type of induction immunosuppression with posttransplant lymphoproliferative disorder, graft survival, and patient survival after primary kidney transplantation*. Transplantation, 2003. **76**(9): p. 1289-93.
129. David, K.M., et al., *Mycophenolate mofetil vs. azathioprine is associated with decreased acute rejection, late acute rejection, and risk for cardiovascular death in renal transplant recipients with pre-transplant diabetes*. Clin Transplant, 2005. **19**(2): p. 279-85.
130. Guthery, S.L., et al., *Determination of risk factors for Epstein-Barr virus-associated posttransplant lymphoproliferative disorder in pediatric liver transplant recipients using objective case ascertainment*. Transplantation, 2003. **75**(7): p. 987-93.

131. McDiarmid, S.V., et al., *Prevention and preemptive therapy of posttransplant lymphoproliferative disease in pediatric liver recipients*. Transplantation, 1998. **66**(12): p. 1604-11.
132. Cao, S., et al., *Long-term outcomes in pediatric liver recipients: comparison between cyclosporin A and tacrolimus*. Pediatr Transplant, 1999. **3**(1): p. 22-6.
133. Pirsch, J.D., et al., *A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation*. FK506 Kidney Transplant Study Group. Transplantation, 1997. **63**(7): p. 977-83.
134. Mayer, A.D., et al., *Multicenter randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporine in the prevention of renal allograft rejection: a report of the European Tacrolimus Multicenter Renal Study Group*. Transplantation, 1997. **64**(3): p. 436-43.
135. Schubert, S., et al., *Diagnosis and treatment of post-transplantation lymphoproliferative disorder in pediatric heart transplant patients*. Pediatr Transplant, 2008.
136. Maecker, B., et al., *CNS or bone marrow involvement as risk factors for poor survival in post-transplantation lymphoproliferative disorders in children after solid organ transplantation*. J Clin Oncol, 2007. **25**(31): p. 4902-8.
137. Savoldo, B., et al., *Cellular immunity to Epstein-Barr virus in liver transplant recipients treated with rituximab for post-transplant lymphoproliferative disease*. Am J Transplant, 2005. **5**(3): p. 566-72.
138. Lorber, M.I., et al., *Everolimus versus mycophenolate mofetil in the prevention of rejection in de novo renal transplant recipients: a 3-year randomized, multicenter, phase III study*. Transplantation, 2005. **80**(2): p. 244-52.
139. Sollinger, H.W., *Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients*. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. Transplantation, 1995. **60**(3): p. 225-32.
140. Lehmkuhl, H. and R. Hetzer, *Clinical experience with Certican (everolimus) in de novo heart transplant patients at the Deutsches Herzzentrum Berlin*. J Heart Lung Transplant, 2005. **24**(4 Suppl): p. S201-5; discussion S210-1.
141. Neyts, J., G. Andrei, and E. De Clercq, *The novel immunosuppressive agent mycophenolate mofetil markedly potentiates the antiherpesvirus activities of acyclovir, ganciclovir, and penciclovir in vitro and in vivo*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(2): p. 216-22.
142. Birkeland, S.A., H.K. Andersen, and S.J. Hamilton-Dutoit, *Preventing acute rejection, Epstein-Barr virus infection, and posttransplant lymphoproliferative disorders after kidney transplantation: use of aciclovir and mycophenolate mofetil in a steroid-free immunosuppressive protocol*. Transplantation, 1999. **67**(9): p. 1209-14.
143. Allison, A.C. and E.M. Eugui, *Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection*. Transplantation, 2005. **80**(2 Suppl): p. S181-90.
144. Weigel, G., et al., *Effect of mycophenolate mofetil therapy on lymphocyte activation in heart transplant recipients*. J Heart Lung Transplant, 2002. **21**(10): p. 1074-9.
145. Koehl, G.E., et al., *Rapamycin protects allografts from rejection while simultaneously attacking tumors in immunosuppressed mice*. Transplantation, 2004. **77**(9): p. 1319-26.
146. Luan, F.L., et al., *Rapamycin blocks tumor progression: unlinking immunosuppression from antitumor efficacy*. Transplantation, 2002. **73**(10): p. 1565-72.
147. Majewski, M., et al., *Immunosuppressive TOR kinase inhibitor everolimus (RAD) suppresses growth of cells derived from posttransplant lymphoproliferative disorder at allograft-protecting doses*. Transplantation, 2003. **75**(10): p. 1710-7.

148. Agüero, J., et al., *Influence of immunosuppression regimen on heart transplantation survival*. Transplant Proc, 2006. **38**(8): p. 2550-2.

## **Lebenslauf**

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

## Publikationsliste

Schubert, S., Renner, C., Hammer, M., Abdul-Khaliq, H., Lehmkuhl, H. B., Berger, F., Hetzer, R., Reinke, P.

*Relationship of immunosuppression to Epstein-Barr viral load and lymphoproliferative disease in pediatric heart transplant patients.*

J Heart and Lung Transplant, 2008. 27(1): p 100-5

## **Danksagung**

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Stephan Schubert, Klinik für angeborene Herzfehler und Kinderkardiologie des Deutschen Herzzentrums Berlin, für die Anregung zu dieser Arbeit und seine immerwährende, freundliche Unterstützung und Motivation bei allen inhaltlichen und methodischen Fragen bedanken.

Herrn Professor Dr. med. H. Abdul-Khaliq, Klinik für Kinderkardiologie und angeborene Herzfehler in Homburg/Saar, danke ich für die wissenschaftliche Hilfe und Betreuung dieser Arbeit.

Frau Dr. med. Angelina Bockelbrink vom Institut für Sozialmedizin, Epidemiologie und Gesundheitsökonomie der Charité danke ich für ihre statistische Beratung und ihr Feedback zu dieser Arbeit.

Nicole Heinz danke ich für die durchweg seit der Schule bestehende Freundschaft und ihre weit reichende emotionale Unterstützung in allen Belangen des Lebens.

Sebastian Kahl möchte ich für die Durchsicht der Arbeit, für seine Ausdauer bei der Formatierung und die große Geduld in den schwierigen Monaten des Jahres 2008 danken.

Meinem Bruder Robert danke ich für die Durchsicht der Arbeit und seine kritischen Verbesserungsvorschläge.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für ihre unermüdliche moralische Unterstützung. Sie ermöglichten mir nicht nur das Studium der Medizin sondern auch die Durchführung dieser Arbeit.

## **Erklärung**

„Ich, Christiane Renner, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

*„Einfluss Immunsuppressiver Medikation auf die Epstein-Barr Viruslast bei Kindern nach Herztransplantation“*

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.“

Berlin 17.11.2008