

Aus dem CharitéCentrum für Tumormedizin  
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie  
Campus Virchow Klinikum

**DISSERTATION**

**Interleukin-6-, Interleukin-10- und TNF-alpha-  
Plasmaspiegel bei Patienten mit transplantations-  
assoziierter lymphoproliferativer Erkrankung**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Frau Sylke Wendland

aus Leer/Ostfriesland

Gutachter/ in:   1. Priv.- Doz. Dr. med. R. U. Trappe  
                      2. Prof. Dr. med. W. Klapper  
                      3. Prof. Dr. med. M. Dreyling

Datum der Promotion: 23.06.2013

# Inhaltsverzeichnis

<b>Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen</b> .....	<b>1</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>2</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>4</b>
1.1 Transplantation und PTLD .....	4
1.2 Epidemiologie, Klassifikation und Therapie der PTLD .....	5
1.2.1 Epidemiologie .....	5
1.2.2 Pathogenese .....	5
1.2.3 Histologische Klassifikation und Stadieneinteilung .....	7
1.2.4 Klinische Symptomatik .....	9
1.2.5 Diagnostik.....	10
1.2.6 Therapie .....	11
1.3 Immunologische Aspekte der PTLD.....	13
1.3.1 Zelluläre Komponenten .....	13
1.3.1.1 T-Lymphozyten.....	13
1.3.1.2 CD4-positive Lymphozyten .....	13
1.3.1.3 CD8-positive zytotoxische T-Zellen.....	14
1.3.1.4 CD8-positive T-Gedächtniszellen.....	14
1.3.1.5 B-Lymphozyten .....	15
1.3.2 Spezielle Zytokine .....	15
1.3.2.1 Interleukin-10.....	15
1.3.2.2 Interleukin-6.....	16
1.3.2.3 TNF-alpha .....	17
1.3.3 HLA-DR Moleküle.....	17
1.4 Immunsuppressive Substanzen .....	18
1.4.1 OKT3 .....	18
1.4.2 Calcineurininhibitoren.....	18
1.4.3 Mycophenolat Motofil (MMF).....	19
1.4.4 Azathioprin .....	19
1.4.5 mTOR-Inhibitoren.....	19
1.5 Fragestellung .....	19

<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
2.1 Studiendesign .....	20
2.2 Patienten .....	21
2.3 Diagnosesicherung und Staging .....	22
2.4 Beurteilung des Ansprechens und Follow-up.....	22
2.5 Bestimmung von IL-6-, IL-10- und TNF-alpha- Plasmaspiegeln .....	23
2.6 Durchflusszytometrische Bestimmung .....	23
2.7 Kontrollgruppe .....	23
2.8 Statistische Analyse .....	24
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>25</b>
3.1 Patientencharakteristik.....	25
3.2 Vergleich der Patienten- mit der Kontrollgruppe.....	28
3.3 Plasmaspiegel von IL-6, IL-10 und TNF-alpha zum Zeitpunkt der PTLD-Diagnose .....	30
3.4 Vergleich der Patientencharakteristik von therapiesensiblen und therapierefraktären Patienten .....	31
3.5 Verlauf der Zytokinpiegel von therapiesensiblen und terapierefraktären Patienten.....	34
3.6 T-Zell Subpopulation bei Diagnosestellung.....	39
3.7 Veränderung von T-Zell-Subpopulation im zeitlichen Verlauf.....	40
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>42</b>
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>50</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>52</b>

# Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

## I Tabellen

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der PTLD 2001 .....	8
Tabelle 2: Ann-Arbor-Klassifikation der PTLD .....	9
Tabelle 3: Therapieschemata der Patienten des PTLD-Registers.....	28
Tabelle 4: Patientencharakteristik und Basischarakteristika der Kontrollgruppe .....	29
Tabelle 5: Charakteristik therapierefraktärer und therapiesensibler Patienten .....	33
Tabelle 6: Gemischtes lineares Regressionsmodell der Zytokinpiegel.....	36
Tabelle 7: Einfluss der EBV-Assoziation auf die Zytokin-Regressionsmodelle .....	38
Tabelle 8: Einfluss der gewählten Therapie auf die Zytokin-Regressionsmodelle.....	38
Tabelle 9: Gemischtes lineares Regressionsmodell für Lymphozytenpopulationen....	40

## II Abbildungen

Bild 1: Zytokinplasmaspiegel bei PTLD-Patienten zum Diagnosezeitpunkt.....	31
Bild 2a: Interleukin-6-Plasmaspiegel von PTLD-Patienten während der Therapie .....	35
Bild 2b: TNF-alpha-Plasmaspiegel von PTLD-Patienten während der Therapie.....	37
Bild 3: Verteilung von aktivierten zytotoxischen T-Zellen bei PTLD-Patienten nach Therapiestart .....	41

## Abkürzungsverzeichnis

ABVD	Adriamycin, Bleomycin, Vinblastin, Dacarbazin
AZA	Azathioprin
BCR	B-Zell-Rezeptor
BCRF1	BamHI-C fragment rightward reading frame 1
CHOP-21	Chemotherapieregime, bestehend aus den Substanzen Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison in 21-täglichen Intervallen
CR	Komplette Remission
CyA	Ciclosporin
CD	Cluster of Differentiation
CTL	Zytotoxische T-Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DLBCL	Diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fc	Kristallisierbares Fragment
G0, G1	Gap0, Gap1-Phase
GN	Glomerulonephritis
FK	Tacrolimus
HLA	Human Leucocyte Antigen
LMP1	Latent Membrane Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMF	Mycophenolat-Mofetil
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NK	Natürliche Killer(zellen)
OKT	Muromonab-CD3
PBC	Primäre biliäre Zirrhose
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	Progrediente Erkrankung

PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PR	Partielle Remission
PTLD	Transplantationsassoziierte lymphoproliferative Erkrankung(en) – posttransplantation lymphoproliferative disorders
SE	Standardabweichung
SD	Stabiler (Krankheits-)Zustand
TCR	T-Zell-Rezeptor
TH	T-Helfer (Zellen)
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
VAD	Chemotherapieregime, bestehend aus den Substanzen Vincristin, Adriamycin, Dexamethason

# **1. Einleitung**

## **1.1 Transplantation und PTLD**

Im Jahr 2011 wurden in Deutschland 4932 Organtransplantationen durchgeführt (1). Seit der ersten Organtransplantation 1963 wurden über 100.000 Organe transplantiert (1). Durch Verbesserungen der Operationstechniken, des perioperativen Managements, der medikamentösen Immunsuppression sowie der peri- und postoperativen Diagnostik leben zunehmend mehr Menschen mit einem transplantierten Organ. Nach einem Jahr funktionieren derzeit noch knapp 90% der transplantierten Nieren, ca. 75% der transplantierten Lungen, Herzen und Bauchspeicheldrüsen und ca. 65% der transplantierten Lebern (1). Diese Entwicklung geht einher mit der Etablierung eines neuen Krankheitsbildes, der transplantations-assoziierten Lymphoproliferationen (PTLD). Es handelt sich hierbei um eine heterogene Gruppe von Lymphomen, denen gemeinsam ist, dass sie bei transplantierten, immunsupprimierten Patienten auftreten.

PTLD sind nach dem malignen Melanom die zweithäufigste Neoplasie nach soliden Organtransplantationen (2). In Abhängigkeit unter anderem des transplantierten Organs beträgt die Inzidenz der PTLD zwischen 1% und 30%. Es sind bislang zwei Faktoren bekannt, die bei der Genese der PTLD sicher eine wichtige Rolle spielen: Das Epstein-Barr Virus und die Art und Dosis der Immunsuppression. Bei pädiatrischer PTLD findet sich bei 90% der Patienten eine histologische EBV-Assoziation (3, 4). Bei erwachsenen Organtransplantierten mit PTLD ist die PTLD in etwa der Hälfte der Fälle EBV-assoziiert (5).

Histomorphologisch handelt es sich in 95% der Fälle von PTLD um B-Zell-Proliferationen. Die monomorphen B-Zell-PTLD machen dabei mit >70% den Hauptanteil aus, wobei in der Gruppe der monomorphen B-Zell-PTLD das diffus großzellige B-Zell Lymphom (DLBCL) dominiert. Nur 5% der PTLD sind T-Zell-Lymphome, Hodgkin- oder Hodgkin-ähnliche Lymphome. Da die PTLD unter den Lymphomen in Bezug auf Pathogenese, Histologie und Therapie eine gewisse Sonderstellung einnimmt, hat die WHO eine eigene Klassifikation (Tabelle 1) eingeführt.

Da es sich letztlich aber um ein junges Krankheitsbild handelt, sind die Erkenntnisse

über die Ätiologie und Therapie der Erkrankung immer noch eingeschränkt. Auch wenn Risikofaktoren wie die Immunsuppression und eine EBV-Infektion als gesichert anzusehen sind, sind viele weitere Vorgänge in der Krankheitsentstehung unklar, so auch die Rolle bestimmter Zytokine und das Ineinandergreifen immunologischer Kontrolle und sekundärer zellulärer Veränderungen, die zur autonomen Proliferation beitragen.

Diese Arbeit beschreibt immunologische Parameter unter verschiedenen Therapieregimen bei Patienten mit PTLD und vergleicht den Verlauf dieser Parameter bei Patienten, die gut auf eine Therapie ansprechen mit schlecht auf eine Therapie ansprechenden Patienten sowie mit Kontrollpersonen.

Das Ziel der Arbeit ist, ein besseres Verständnis der Krankheit zu erlangen und dadurch zu individuell besser angepassten Therapiestrategien beizutragen.

## **1.2. Epidemiologie, Klassifikation und Therapie der PTLD**

### 1.2.1 Epidemiologie

Das Risiko, an einer PTLD zu erkranken, liegt nach Lungentransplantation bei ca. 8%, nach Nieren-, Herz- oder Lebertransplantation zwischen 1 und 5% (6, 7). Es gibt zwei Häufigkeitsgipfel für das Auftreten von PTLD: In den ersten 12 Monaten nach Transplantation werden ungefähr 50% der Erkrankungen erstdiagnostiziert (frühe PTLD). Ebenfalls 50% der Erkrankungen werden ca. 5-10 Jahre nach der Transplantation diagnostiziert (späte PTLD) (8). Die PTLD unterscheiden sich in Bezug auf Manifestation, Histologie und EBV-Assoziation, je nachdem, ob es sich um eine „frühe PTLD“ oder eine „späte PTLD“ handelt (s.u.).

50% aller EBV-naiven Transplantatempfänger, die ein Organ von einem EBV-positiven Spender erhalten, erfahren eine primäre, klinisch manifeste EBV-Infektion, die häufig in eine PTLD mündet (9).

### 1.2.2 Pathogenese

Hauptrisikofaktoren zur Entwicklung einer PTLD sind somit erstens die EBV-inkompatible Organtransplantation (positiver Donor, negativer Empfänger) und zweitens die Immunsuppression, wobei sowohl die Art als auch die Intensität der Immunsuppression eine wichtige Rolle spielen. (10, 11)

Das Epstein-Barr-Virus, auch Humanes Herpesvirus Typ 4 genannt, ist ein DNA-Virus und gehört zu der Familie der Herpesviridae und der Subfamilie der Gammaherpesviridae. Die genannte Kombination EBV-naiver Empfänger und EBV-infizierter Spender ist bei erwachsenen Transplantatempfängern selten, da bis zum 30. Lebensjahr über 90% der Bevölkerung mit dem Epstein-Barr-Virus durchseucht ist (12).

Die Primärinfektion mit EBV kann sowohl klinisch apparent als auch unauffällig verlaufen. Immunkompetente Personen reagieren auf diese Infektion mit einer massiven Expansion virusspezifischer und unspezifischer T-Zellen, die für eine weitgehende Elimination der infizierten B-Zellen sorgen. Eine kleine Zahl der Viren persistiert jedoch in den B-Zellen. Diese bei immunkompetenten Personen ungefährliche Persistenz, kann bei immunsupprimierten Personen zu einer erhöhten Anzahl EBV-infizierter B-Zellen im Blut (13) und zu einer erhöhten Aktivität des Virus führen. Während bei immunkompetenten Personen das Virus lediglich ein Protein produziert, produzieren infizierte B-Zellen immunsupprimierter Personen mehr virale Proteine, wie beispielsweise das EBV-spezifische „latent membrane protein 1“ (LMP1), das auf zelluläre Mechanismen der Wachstumskontrolle wirkt und zur Hyperproliferation von B-Zellen führt (14). Diese unkontrollierte B-Zell-Proliferation führt häufig zur Entwicklung einer PTLD.

Darüber hinaus ist es jedoch sehr wahrscheinlich, dass noch weitere Mechanismen an der Lymphomentstehung beteiligt sind, da nicht alle Patienten mit iatrogener T-Zell-Dysfunktion ein Lymphom entwickeln. So liegt die Vermutung nahe, dass eine Dysregulation bei der Produktion bestimmter Zytokine, die ihrerseits die B-Zell-Proliferation beeinflussen, kausal beteiligt sein könnte. Im Fokus des Interesses stehen vor allem Interleukin-6 und Interleukin-10, da bereits bekannt ist, dass diese Interleukine die B-Zell-Entwicklung beeinflussen und in engem Zusammenhang mit EBV zu betrachten sind: Interleukin-6 fördert die Proliferation und die Tumorentstehung EBV-infizierter B-Zellen (15, 16). Interleukin-10 wird unter anderem von EBV-infizierten B-Zellen gebildet (17) und kann hiernach die Virusvermehrung fördern, indem Interleukin-10 (unter anderem) immunsuppressiv wirkt und die Interferon-gamma-Freisetzung hemmt. Interferon-gamma hemmt seinerseits unter anderem die EBV-Replikation (18- 20).

Je früher sich die PTLD nach einer Transplantation entwickelt, umso direkter ist das EBV an der Pathogenese beteiligt. EBV scheint hingegen bei späten PTLD als wachstumsfördernder Trigger der B-Zellen entbehrlich zu sein (21, 22).

Dosis und Art der Immunsuppression sind ebenfalls wichtige Faktoren für die PTLD-Entstehung. Beispielsweise steigt nach einer intensivierten Immunsuppression aufgrund einer akuten Abstoßungsreaktion das Risiko eine PTLD zu entwickeln (23). Inwieweit substanzspezifische Unterschiede das Risiko für eine PTLD beeinflussen wird hingegen kontrovers diskutiert. So haben z.B. Birkeland et al. beobachtet, dass eine immunsuppressive Therapie mit MMF nach Nierentransplantation eine geringere Inzidenz für PTLD zeigt als eine Immunsuppression mit anderen Substanzen (11). Swinnen et al. sahen bei der Therapie mit OKT3 eine deutlich erhöhte Inzidenz von PTLD (10, 24). Gao et al. konnten hingegen keine Korrelation der unterschiedlichen immunsuppressiven Regime mit dem Auftreten einer PTLD feststellen (23).

### 1.2.3 Histologische Klassifikation und Stadieneinteilung

Differenziert werden muss die PTLD in Hinblick auf ihre Morphologie sowie auf ihre Klonalität. Beides ist stark von dem zeitlichen Punkt der Entstehung einer PTLD abhängig: Bei der sogenannten „Frühen PTLD“, d.h. die Entstehung der PTLD findet innerhalb des ersten Jahres nach der Transplantation statt, finden sich häufiger unterschiedliche B-Zell-Klone sowie eine polymorphe Histologie. Außerdem besteht eine hohe Rate an EBV-Assoziation. Bei der monomorphen PTLD (ca. 70% aller Fälle mit PTLD) ist die PTLD in aller Regel monoklonal. Die Rate der EBV-Assoziation beträgt 50% (5). Die Monomorphe PTLD tritt häufiger jenseits des ersten Jahres nach Transplantation auf, kann aber auch innerhalb des ersten Jahres auftreten.

Die WHO klassifiziert die PTLD wie folgt (25):

**Tabelle 1: WHO-Klassifikation der PTLD, 2001**

<b>Histologischer Subtyp</b>	<b>Häufigkeit</b>
<b>Frühe Läsionen</b> - Plasmazellhyperplasie - infektiöse Mononukleose-ähnliche PTLD	ca. 5%
<b>Polymorphe PTLD</b>	15- 20%
<b>Monomorphe B-Zell-PTLD</b> (Subklassifikation entsprechend der WHO-Klassifikation für B-Zell-Lymphome) - diffus großzelliges Lymphom (immunoblastisch, zentroblastisch, anaplastisch) - Burkitt/Burkitt-ähnliches Lymphom - Plasmazell-Myelom - Plasmozytom-ähnliches Lymphom - andere Typen	> 70%
<b>Monomorphe T-Zell-PTLD</b> (Subklassifikation entsprechend der WHO-Klassifikation für T-Zell-Lymphome) - peripheres T-Zell Lymphom, nicht weiter spezifiziert - andere Typen	<5%
<b>Hodgkin oder Hodgkin-ähnliche PTLD</b>	<5%

Anders als bei den klassischen Lymphomen liegen der PTLD seltener genetische Veränderungen zugrunde, wobei typische Merkmale wie die c-myc-Translokation beim Burkitt-Lymphom, aber auch bei PTLD beschrieben worden sind (26), ebenso wie Mutationen von Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen analog der Verhältnisse bei DLBCL (27, 28).

Die Stadieneinteilung der PTLD erfolgt ähnlich wie beim klassischen Lymphom nach der Ann-Arbor-Klassifikation. Bei der PTLD ist, im Gegensatz zu klassischen Lymphomen, der extranodale Befall jedoch sehr viel häufiger (ca. 70% der Fälle zeigen mindestens eine extranodale Manifestation). Demzufolge liegt entsprechend der Ann-Arbor-Klassifikation bei einer Vielzahl von Patienten bei Erstdiagnose bereits ein fortgeschrittenes Stadium (III oder IV) vor (5).

**Tabelle 2: Ann- Arbor- Klassifikation der PTLD, 2001**

<b>Stadium</b>	<b>Primär nodale Manifestation (30%)</b>	<b>Primäre extranodale Manifestation (70%)</b>
I	Befall einer Lymphknotenregion	Befall eines extralymphatischen Organs (IE)
II1	Befall von zwei benachbarten Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells (II1) oder Befall einer Lymphknotenregion mit lokalisiertem Übergang auf ein Organ (II1E)	Befall eines extralymphatischen Organs einschließlich der regionalen Lymphknoten oder eines weiteren extralymphatischen Organs auf einer Seite des Zwerchfells (II1E)
II2	Befall von zwei nicht benachbarten oder mehr als zwei benachbarten Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells (II2) einschließlich eines lokalisierten Befalls eines extralymphatischen Organs (II2E)	Befall eines extralymphatischen Organs Lymphknotenbefall, der über regionalen Lymphknoten hinausgeht und auch einen weiteren lokalisierten Organbefall einschließen kann (II2E)
III	Befall von Lymphknotenregionen auf beiden Seiten des Zwerchfells (III) einschließlich eines lokalisierten Befalls eines extralymphatischen Organs (III E) oder der Milz (IIIS) oder von beidem (III SE)	Befall eines extralymphatischen Organs und Lymphknotenbefall auf beiden Seiten des Zwerchfells einschließlich eines weiteren lokalisierten Befalls eines extralymphatischen Organs (III E) oder der Milz (IIIS) oder von beidem (III SE)
IV	Lymphknotenbefall mit diffusem oder disseminierten Befall extralymphatischer Organe	Diffuser oder disseminierter Organbefall mit oder ohne Lymphknotenbefall

#### 1.2.4 Klinische Symptomatik

Die klinische Symptomatik ist unspezifisch und außerdem bei Kindern und Erwachsenen sowie zu den Zeitpunkten des Auftretens der PTLD verschieden. Bei Kindern, die häufig EBV-naiv sind, ist die Symptomatik häufig mononukleoseartig mit B-Symptomatik und Lymphadenopathie, v.a. cervicalen Lymphknoten. Bei Erwachsenen gibt es die zwei genannten Häufigkeitsgipfel für eine PTLD. Bei der „frühen PTLD“ ist der Befall häufig extranodal. Bei der „späten PTLD“ findet sich neben dem häufigen extranodalen Befall gelegentlich auch ein alleiniger nodaler Befall. Die am häufigsten befallenen Organe sind die Leber (30-40%), der Gastrointestinal-Trakt (20-25%), Lunge (15-20%), Nieren (10-15%) und zentrales Nervensystem (10%). Die transplantierten Organe zeigen zu 15-20% eine PTLD-Infiltration (29). Auch das Knochenmark ist nicht selten betroffen. Die "späte PTLD" zeigt eine geringere EBV-Assoziation als die „frühe PTLD“.

Häufig ist die Diagnose ein Zufallsbefund im Rahmen einer Routineuntersuchung in den Transplantationsambulanzen. Fulminant verlaufende PTLDs sind aufgrund

unspezifischer Symptome schwierig zu erkennen. Es zeigen sich diffuse Organinfiltrationen mit septischen Krankheitsverläufen und Multiorganversagen. Dies ist klinisch schwer von einer schweren Rejektion oder einer bakteriellen Sepsis zu unterscheiden. Deswegen ergibt sich die Diagnose in diesen Fällen oft erst bei Autopsien.

#### 1.2.5 Diagnostik

Die Diagnostik muss verschiedene Bereiche klären: Es muss eine gründliche Anamnese bezüglich der Transplantation, der Transplantatfunktion und der Immunsuppression sowie Nebenwirkungen der Immunsuppression erfolgen. Diese Fragen dienen der Einschätzung der Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer PTLD und im Weiteren bereits der Einschätzung des individuellen Risikoprofils sowie der ersten therapeutischen Option.

Bei den laborchemischen Untersuchungen muss ein zellulärer Immunstatus erfolgen, bei dem die Zahl der CD4-Lymphozyten Aufschluss über die aktuelle Immunsituation des Patienten geben kann. Der Stellenwert des Nachweises von EBV-DNA im peripheren Blut ist weiterhin unklar. Da die PTLD bei EBV-Primärinfektion einer antiviralen Therapie zugänglich ist, sollte in jedem Fall aber eine EBV-Serologie erfolgen. Die EBV-PCR im Blut ist bei EBV-Primärinfektion positiv und in der Regel werden sehr hohe EBV-Lasten im Vollblut wie auch im Serum nachgewiesen.

An bildgebender Diagnostik sind schnittbildgebende Verfahren von Hals, Thorax und Abdomen erforderlich. Zur Evaluation einer Knochenmarkbeteiligung bei PTLD muss eine histopathologische Beurteilung einer Knochenmarkstanze erfolgen, und die Diagnose der PTLD muss durch histopathologische Beurteilung einer Probeexzision/Biopsie eines exstirpierten Lymphknotens oder aus einem befallenen Organ erfolgen. Da bei bis zu 10% der Patienten eine ZNS-Beteiligungen vorliegt, sind auch bildgebende Verfahren des Schädels (cCT, cMRT) sowie eine Liquorpunktion empfehlenswert. Aufgrund einer ebenfalls häufigen Beteiligung des Gastrointestinaltrakts bei PTLD (in 20-25% der Fälle) ist eine Ösophago-Gastro-Duodenoskopie und bei entsprechender Symptomatik auch eine Koloskopie, ggf. mit bioptischer Probenentnahme, regelhaft anzustreben. Schwierigkeiten in der Ausbreitungsdiagnostik macht der Dünndarmbefall durch PTLD-Lymphome. Die CT-Diagnostik und die Darmsonographie sind hier als Alternative zur Panendoskopie hilfreich.

### 1.2.6 Therapie

Für die Behandlung der CD20-positiven PTLD konnte in den vergangenen Jahren in prospektiven Phase II Studien erstmals ein Therapiestandard etabliert werden, der zum Teil bereits Eingang in die Therapieempfehlungen einzelner Fachgesellschaften gefunden hat (30). Als gesichert gilt, dass bereits eine Reduktion der Immunsuppression bei einem Teil der Patienten zu einer Remission führen kann (31, 32, 33). Viele Patienten benötigen aber eine zusätzliche Therapie. Zum Einsatz von Rituximab in der Monotherapie der PTLD liegen bei erwachsenen Patienten aktuell drei Phase II Studien mit insgesamt 98 Patienten vor (3, 4, 34), die hohe Ansprechraten bei minimaler Toxizität gezeigt haben. Allerdings zeigt ein Anteil von etwa 50% der Patienten innerhalb von 6 Monaten einen erneuten Progress nach einer Rituximab-Monotherapie (35). 2012 wurde die Auswertung der PTLD-1 Studie zur sequentiellen Immunochemotherapie der PTLD mit 4 Gaben Rituximab gefolgt von 4 Zyklen CHOP-21 vollpubliziert (5). Diese Daten zeigen im Gegensatz zur Rituximab-Monotherapie in einem einheitlich behandelten Kollektiv von 70 Patienten ein deutlich längeres Gesamtüberleben von median 6.6 Jahren für die sequentielle Therapie versus 2.4 Jahren für die Rituximab-Monotherapie. Da die früher als erheblich einzuschätzende Infektionstoxizität unter einer CHOP-basierten Chemotherapie durch die verzögerte Gabe und die „Vorphasebehandlung“ mit Rituximab auf unter 10% gesenkt werden konnte (5), wird diese Therapie von einer zunehmenden Zahl von Ärzten als neuer Therapiestandard angesehen. Vergleichende Phase-III-Daten fehlen bei PTLD vollständig und sind aufgrund der Seltenheit der Erkrankung in den nächsten Jahren auch nicht zu erwarten. Inwieweit neue Substanzen, eine synchrone Immunochemotherapie oder dosisreduzierter Chemotherapieregime für selektierte Subgruppen sinnvoll sind, bleibt abzuwarten (36). Die geringe Inzidenz der PTLD bringt es mit sich, dass für die Therapie CD20-negativer PTLD und die Rezidivsituation weiterhin auf Fallbeschreibungen und wenige kleine, zumeist retrospektiven Serien zurückgegriffen werden muss. Retrospektiven Studien gemein ist, dass sie häufig verschiedene Behandlungen miteinander kombinieren, wie z.B. die Reduktion der Immunsuppression, antivirale Therapien, monoklonale Antikörper und Chemotherapien und dies die Möglichkeiten der Generalisation stark einschränkt.

Limitierender Faktor des Maßes der Reduktion der Immunsuppression ist die Gefahr einer Transplantatrejektion, so dass dies individuell und in Zusammenarbeit zwischen Transplantationsmedizinern und Hämatologen erfolgen muss, zumal es keine einheitlichen Empfehlungen zu der Immunsuppressionsreduktion gibt. Letztlich bleibt ein objektivierbares Ansprechen bei Erwachsenen häufig aus, so dass weitere therapeutische Maßnahmen angegangen werden müssen (37, 38).

Eine Bestrahlung oder die chirurgische Exstirpation singulärer Läsionen ist - zusätzlich zur Reduktion der Immunsuppression - in einzelnen Fällen mit limitierter Erkrankung (Stadium I/II) ebenfalls eine sinnvolle und mögliche therapeutische Option (32, 38).

Bei histomorphologisch EBV-assoziiierter PTLD im Kontext einer EBV-Primärinfektion kann eine antivirale Therapie mit Foscarnet oder Cidofovir zu einer kompletten und anhaltenden Remission des Lymphoms führen, wobei die EBV-assoziierte PTLD ausserhalb der Primärinfektion offensichtlich hierauf nicht anspricht (Konsens des Europäischen PTLD-Expertentreffens, Paris 2007).

Andere Therapieansätze sind der Einsatz von Interferon-Alpha (33), Interleukin-6-Antikörper (39) oder der Einsatz von EBV-spezifischen T-Zellen bei EBV-assoziiierter PTLD (40).

Innerhalb von Studien wird die PTLD derzeit in der PTLD-1-Studie (5. Amendment) mit einer risikostratifizierten sequenzielle Therapie aus 4 wöchentlichen Gaben Rituximab, gefolgt von 4 weiteren Zyklen Rituximab im Fall einer bereits nach den ersten 4 Gaben erreichten kompletten Remission, bzw. gefolgt von 4 Zyklen R-CHOP-21 + GCSF (in allen anderen Fällen), behandelt. Patienten, die nach Applikation der Chemotherapie ein Ansprechen, aber keine komplette Remission zeigen, erhalten bei PET-Positivität zusätzlich eine Konsolidierung mit 2 Zyklen Rituximab, Carboplatin und Etoposid.

Darüber hinaus werden Patienten mit selteneren Subformen der PTLD, PTLD mit ZNS-Beteiligung oder Rezidiv seit 2006 in ein prospektives Register der Deutschen PTLD Studiengruppe eingeschlossen (41). Die Behandlung erfolgt individuell entsprechend der aktuellen Empfehlungen der Studiengruppe.

In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten aus der PTLD-1 Studie und dem PTLD-Register eingebracht.

### **1.3 Immunologische Aspekte bei PTLD**

Die Regulation des Immunsystems durch Zytokine bei PTLD und der Beitrag von Zytokinen bei der Entstehung und Aufrechterhaltung einer PTLD sind bisher wenig erforscht. Hier schließt sich die Frage an, ob der Verlauf bestimmter Parameter prognostische Bedeutung für die Therapie und den weiteren Genesungsverlauf besitzt.

#### 1.3.1 Zelluläre Komponenten des Immunsystems

##### 1.3.1.1 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind Zellen der spezifischen zellulären Immunabwehr, die im Thymus geprägt werden, d.h. eine spezifische Umlagerung der T-Zell-Rezeptorsequenzen erfahren, und sich fortan im peripheren lymphatischen Gewebe, der Lymphe und im Blut aufhalten, bis sie auf ein ihrem Rezeptor entsprechendes Antigen treffen und sich dann durch klonale Proliferation stark vermehren. T-Lymphozyten besitzen, wie alle kernhaltigen Zellen des menschlichen Körpers, auf ihrer Zelloberfläche Antigene die sie charakterisieren und spezifizieren. Mittels dieser membrangebundenen Glykoproteine, sogenannter Cluster of Differentiation (CD), können Lymphozyten in verschiedene Subpopulationen mit unterschiedlichen Funktionen unterteilt werden. Charakteristisch für reife T-Lymphozyten ist das CD3-Antigen. Funktionell spielt CD3 eine wichtige Rolle für die Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptors (TCR).

##### 1.3.1.2 CD4-positive Lymphozyten (T-Helferzellen)

Das CD4-Antigen findet sich spezifisch auf T-Lymphozyten die in der Lage sind, antigenes Material in Assoziation mit MHC-Klasse-II-Molekülen zu erkennen und charakterisiert diese Zellen hauptsächlich als T-Helferzellen. Nach einer MHC-II-assoziierten Antigenpräsentation proliferieren die T-Helferzellen zunächst und differenzieren sich dann sogenannten Effektorzellen: Th1- oder Th2-Zellen. Beide Arten der T-Zellen sezernieren Zytokine, jedoch bewirken die sezernierten Zytokine der Th1-Zellen (z.B. Interferon-gamma) eine inflammatorische, zelluläre Reaktion durch Aktivierung von Makrophagen; Th2-Zellen bewirken hingegen, unter anderem durch die Sekretion von Interleukin-10, eine humorale Reaktion durch Stimulation von B-Zellen. CD4-positive T-Zellen besitzen selbst keine zytotoxischen Eigenschaften.

Das CD4-Polypeptid mit seinen fünf Regionen (drei extrazellulären, einer transmembranen und einer zytoplasmatischen) stabilisiert die Reaktion zwischen dem TCR und dem MHC der Antigen-präsentierenden Zelle und ist somit ein Korezeptor.

#### 1.3.1.3 CD8-positive zytotoxische T-Zellen (CTLs)

Das CD8-Molekül ist kleiner als das CD4-Molekül, im Aufbau prinzipiell jedoch ähnlich in Domänen organisiert (42). Es wird vorwiegend auf T-Lymphozyten - häufig auf zytotoxischen Lymphozyten (CTL) - exprimiert, die antigene Substanzen im Kontext von MHC-Klasse-I-Molekülen erkennen. CTLs erkennen mittels ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) allogene bzw. "verfremdete" MHC-Klasse-I-Komplexe und leiten dann z.B. eine Abstoßungsreaktion ein. Sie haben die Fähigkeit, mehrere Zellen nacheinander zu eliminieren, d.h. als Effektorzellen heften sie sich an ihre Zielzellen, induzieren zytolytische Vorgänge und trennen sich dann wieder von ihnen. Auf diese Weise kann eine kleine Population von CTLs eine deutlich größere Population von Zielzellen eliminieren. Die Einleitung der Zytolyse durch CTLs erfolgt auf zwei unterschiedlichen Wegen: Erstens durch intrazelluläre Ausbildung und Formierung von Granula, die nach Aktivierung der T-Zelle einsetzt. Diese Granula enthalten verschiedene Proteinkomponenten wie Perforin, Serinproteasen und anderen Enzymen (z.B. Granzym B), die nach Anlagerung an die Zielzelle in diese eindringen (43-45). In der Zielzelle entfaltet Granzym B seine Wirkung über mehrere molekulare Reaktionen, die letztlich zur Apoptose führen.

Zweitens sind CTLs auch über ihren TCR und das MHC-I-Molekül der Zielzelle zur direkten Rezeptor-vermittelten Apoptoseinduktion fähig (sogenannte „Fas-induzierte Apoptose“) (46, 47).

#### 1.3.1.4 CD8-positive T-Gedächtniszellen

CD8-positive T-Gedächtniszellen üben ihre Effektorfunktion nach erneutem antigenen Stimulus sehr effizient und schnell aus, weil sie in der Lage sind, bei Re-Infektionen durch die gleichen pathologischen Erreger die die Erstinfektion verursacht haben, rasch große Mengen von Zytokinen und Chemokinen zu sezernieren.

### 1.3.1.5 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten werden ebenfalls der spezifischen Immunabwehr zugerechnet. Ihre Aufgaben sind die Antigenpräsentation und die Produktion von antigenspezifischen Antikörpern (Immunglobulinen). B-Lymphozyten tragen spezielle Zellmarker (CD19, CD20, CD21, CD79a) und weisen weitere charakteristische Oberflächenmoleküle, wie z.B. Fc-Rezeptoren für Immunglobuline, C3-Komplementrezeptoren, MHC-Klasse-II-Moleküle und EBV-Rezeptoren auf. Sie reifen im Knochenmark und in den peripheren lymphatischen Organen heran, wobei hier zwischen antigenunabhängiger Reifung (Knochenmark) und der terminalen, antigenabhängigen Reifung (periphere lymphatische Organe) unterschieden wird. Nachdem die Zellen verschiedene Entwicklungsstadien durchlaufen haben, beginnen sie im Übergang vom unreifen zum reifen Stadium das Knochenmark zu verlassen und wandern mit dem Blut in die Peripherie. Sie proliferieren in dieser Phase stark und exprimieren nun alle Oberflächenmarker (CD19, CD20, CD21, CD23, CD24, CD38, sowie die Immunglobuline IgD und IgM) in großer Intensität. Die naiven B-Zellen reifen in den sekundären lymphatischen Organen zu reifen B-Zellen, die in der Lage sind, antigene Peptide T-Zellen zu präsentieren. Auslösend für diese Reifung ist der spezifische Antigen-Kontakt mit dem Immunglobulinrezeptor (BCR) der jeweiligen B-Zelle. Im Zuge einer Interaktion zwischen B- und T-Zelle kommt es in der B-Zelle u.a. zu einer Induktion von Interleukin-10, aber auch von IL-4, IL-7 und IL-13. Nach Selektion im Bereich der Lymphfollikel findet dann die klonale Expansion statt, wobei sich die meisten B-Lymphozyten zu Antikörper-bildenden Plasmazellen entwickeln und nur wenige zu langlebigen Gedächtniszellen ausreifen.

### 1.3.2 Spezielle Zytokine

#### 1.3.2.1 Interleukin-10

Interleukin-10 wurde 1989 als ein pleiotrop wirkendes Zytokin entdeckt, das primär von Th2-Zellen gebildet wird (48). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass das Zytokin von vielen verschiedenen Zellen gebildet wird, wie zum Beispiel von Monozyten, Makrophagen und von B-Zellen (49).

Es hat sowohl immunsupprimierende als auch immunstimulierende Wirkungen. Beides scheint relevant für die Entwicklung einer PTLD zu sein. Interleukin-10 wirkt immunsupprimierend, indem es die Zytokin-Produktion von Th1-Zellen hemmt (50), dadurch eine antigen-spezifische Aktivierung und Proliferation der T-Zellen

unterdrückt (49) und so maßgeblich an der Weichenstellung der B-Zell-Aktivierung einschließlich Antikörperproduktion zu Ungunsten des inflammatorischen Wegs mittels T-Zellen beteiligt ist. Die Hemmung der Zytokin-Freisetzung scheint durch Unterdrückung der antigenpräsentierenden Funktion der Makrophagen und Monozyten zustande zu kommen (49, 51, 52).

Zu den immunsupprimierenden Effekten gehört außerdem die direkte Senkung der T-Zell-Proliferation (53, 54). Andererseits stimuliert Interleukin-10 das Immunsystem insofern, als dass es die B-Zell-Proliferation und die Differenzierung in Immunglobulin-sezierende Zellen sowie die Immunglobulin-Freisetzung steigert (48, 55). Interleukin-10 wird als autokriner Wachstumsfaktor für B-Zellen angesehen (17) und schützt B-Zellen vor Apoptose (56).

Auch eine EBV-Infektion von B-Zellen kann zu erhöhter Interleukin-10-Produktion führen, die zu weiterem Zellwachstum stimuliert (56, 57).

Außerdem existiert eine bemerkenswerte funktionelle und strukturelle Ähnlichkeit zwischen humanem Interleukin-10 und einem Protein des Epstein-Barr-Virus, das von dem Gen BCRF-1 kodiert (49, 51, 58, 59) und virales Interleukin-10 (vInterleukin-10) genannt wird. Beispielsweise bewirken humanes Interleukin-10 und vInterleukin-10 die Downregulation des MHC-Klasse-II-Komplexes auf Monozyten, so dass diese weniger Antigene den CD4+ T-Zellen präsentieren können, was in einer verminderten antigenspezifischen T-Zell-Antwort mündet (53) - gleichbedeutend mit einer einfacheren Persistenz des Virus in den B-Zellen.

Das Epstein-Barr-Virus macht sich also anscheinend die immunsuppressiven Eigenschaften von Interleukin-10 zunutze.

#### 1.3.2.2 Interleukin-6

Dieses Zytokin wird von einer Reihe von Zellen, u.a. T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen (60) produziert. Es wird nach Stimulation durch TNF-alpha und Interleukin-10 gebildet.

Interleukin-6 gehört zu den wichtigsten proinflammatorischen Zytokinen des menschlichen Körpers und wirkt lokal an einem Entzündungsherd (beispielsweise indem mittels Chemotaxis Leukozyten angelockt werden) oder auch systemisch im Rahmen einer Sepsis. Allgemeine Wirkungen sind die Produktion von Akute-Phase-Proteinen in der Leber, die vermehrte Stimulation und Freisetzung von Leukozyten aus dem Knochenmark (61, 62) und die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen

in zytotoxische Zellen (63) sowie die Entstehung von Fieber. Wegen der letztgenannten Fähigkeit zählt Interleukin-6 neben Interleukin-1 und TNF-alpha auch zu den sogenannten Pyrogenen.

In Plasmazellen stimuliert Interleukin-6 die Antikörperproduktion (64, 65) ohne die B-Zell-Proliferation zu fördern (66).

Interleukin-6 spielt eine Rolle bei nicht-EBV-assoziierten humanen Tumorerkrankungen von B-Zellen wie zum Beispiel bei dem multiplen Myelom (67-69), wie auch bei dem Wachstum von B-Zellhybriden (66). Bei dem Castleman-Tumor, einem benignen Lymphom, das von den Plasmazellen ausgeht und bei dem klinisch eine große Ähnlichkeit zur PTLD besteht, kommt es ebenfalls zu einer starken Interleukin-6-Sekretion (10, 70). Es gibt Hinweise, dass Interleukin-6 bei der Transformation EBV-immortalisierter B-Zellen in maligne Zellen eine Rolle spielt (60). Außerdem ist bekannt, dass Interleukin-6 die Proliferation und Tumorentstehung EBV-infizierter B-Zellen unterstützt (15) und als autokriner Wachstumsfaktor in EBV-transformierten Zellen fungieren könnte (71). In hohen Dosen hemmt Interleukin-6 jedoch das Wachstum EBV-infizierter B-Zellen, so dass dieses Zytokin dosisabhängig sowohl stimulierende als auch hemmende Wirkungen auf das Wachstum EBV-infizierter Zellen ausübt (72).

#### 1.3.2.3 TNF-alpha

Tumornekrosefaktor alpha (TNF-alpha) ist ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin, welches unter anderem von Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten gebildet werden kann und unter anderem Fieberreaktionen auslöst und die Leber zur Bildung verschiedener Akute-Phase-Proteine stimuliert. TNF-alpha stimuliert auch die Freisetzung von Interleukin-6 (21). Darüber hinaus induziert TNF-alpha lokale Reaktionen, wie die Aktivierung von Endothelzellen mit der Folge einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität und prokoagulatorische Reaktionen.

#### 1.3.3 HLA-DR Moleküle

Das HLA-DR-Molekül stellt einen Zelloberflächenrezeptor, den major histocompatibility complex (MHC), dar. Intrazelluläre, zu Peptiden einer Größe von 9 Aminosäuren prozessierte Proteine, werden im Kontext mit HLA-DR auf der Oberfläche präsentiert und können so durch T-Helferzellen über den T-Zell-Rezeptor erkannt werden. Neben der Bedeutung als Oberflächenantigen, das Transplantat-

Abstoßungen verursachen kann (graft-versus-host), ist HLA-DR entscheidend für die Antigenität von Tumorzellen und für die Präsentation von EBV-Proteinen EBV-infizierter Zellen.

Die Zahl der HLA-DR-Moleküle auf den Zelloberflächen unterliegt verschiedenen Regulationsmechanismen. Eine zunehmende Menge von HLA-DR-Antigenen auf der Zelloberfläche ist oft als Antwort einer Immunstimulation anzusehen und somit ein Marker für die Immunaktivität

#### **1.4 Immunsuppressive Substanzen**

Für eine effektive Immunantwort ist das Zusammenspiel aller Leukozyten unabdingbar. Dieses Zusammenspiel wird iatrogen durch die Immunsuppression gestört, ein in Bezug auf die Prävention der Transplantatabstoßung gewünschter Effekt. Die unterschiedlichen Immunsuppressiva haben hier verschiedene Angriffspunkte:

##### 1.4.1 OKT3

OKT3 ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen die CD3-Antigene von T-Zellen gerichtet ist und so zu einer globalen T-Zell-Depletion führt. OKT steht in dem Verdacht, aufgrund dieser Eigenschaft mit einem sehr hohen PTLD-Risiko assoziiert zu sein (73). Der Einsatz als Immunsuppressivum zur vorbeugenden Transplantatabstoßung ist aufgrund modernerer, weniger nebenwirkungsreicher Immunsuppressiva insgesamt selten geworden.

##### 1.4.2 Calcineurininhibitoren

Calcineurininhibitoren wie Ciclosporin und Tacrolimus sind die derzeit am häufigsten verwendeten Immunsuppressiva. Sie hemmen die Signaltransduktionsvorgänge in T-Lymphozyten, die den Übergang aus der G0-Phase in die G1-Phase regulieren. Ferner führen sie zur Hemmung der Produktion von Interleukin-2, wodurch die zelluläre T-Zell-Antwort gehemmt wird.

#### 1.4.3 Mycophenolat Motefil (MMF)

MMF inhibiert selektiv die Proliferation von T- und B-Lymphozyten. Es wird in erster Linie in Kombination mit Ciclosporin und Glukokortikoiden zur Prophylaxe der akuten Rejektion nach Nierentransplantation angewendet.

#### 1.4.4 Azathioprin

Azathioprin ist eigentlich ein Zytostatikum, das jedoch, wie viele Zytostatika, auch immunsuppressiv wirkt, da die Empfindlichkeit von lymphatischem Gewebe gegenüber zytotoxischen Substanzen relativ hoch ist. Azathioprin hemmt ebenfalls vor allem T-Lymphozyten.

#### 1.4.5 mTOR-Inhibitoren

Strukturell besteht große Ähnlichkeit zu dem Calcineurininhibitor Tacrolimus, jedoch hemmen diese Substanzen statt Calcineurin ein Enzym namens mammalian target of rapamycin (mTOR), wodurch die Zellproliferation unterbunden wird. Hieraus resultiert eine sehr effektive Unterdrückung der T-Zellaktivierung auf Stimulation durch Zytokine.

Zur Prophylaxe einer Organabstoßung werden Kombinationen der immunsuppressiven Substanzen eingesetzt, am häufigsten Calcineurininhibitoren und ein Glukokortikoid und teilweise zusätzlich Azathioprin. Vor allem nach Nierentransplantation wird statt Azathioprin zunehmend Mycophenolat Motefil eingesetzt.

### **1.5 Fragestellung**

Die immunologischen Veränderungen bei einer PTLD sind bisher nur zum Teil verstanden. Ein Zusammenhang zwischen der Immunsuppression und dem Risiko an einer PTLD zu erkranken kann als gesichert angesehen werden. Ebenso die Möglichkeit, durch eine Rekonstitution des Immunsystems eine Rückbildung der Erkrankung zu bewirken. Dennoch sind lymphoproliferative Erkrankungen, insbesondere die monomorphe PTLD, in vielen Fällen als autonome Lymphoproliferationen anzusehen, bei denen zum Teil auch charakteristische Treibermutationen nachgewiesen werden können (z.B. c-myc-Translokationen). Dass

aber auch im Einzelfall aggressive, monoklonale Erkrankungen auf eine Wiederherstellung der immunologischen Kontrolle ansprechen können, ist belegt. Insofern ist anzunehmen, dass die immunologischen Kontrollmechanismen auch eine wichtige Funktion in der Kontrolle der minimalen Resterkrankung bei PTLD spielen und damit Einfluss auf das Rezidivrisiko der PTLD nehmen können. Bisher existieren keine Arbeiten, die die Veränderungen von T-Zell-Subpopulationen und Interleukinen in einer größeren Zahl von Patienten mit PTLD unter und nach Therapie beschrieben hätte. Ein tieferes Verständnis dieser Parameter könnte aber helfen, Therapien frühzeitiger als jetzt zu indizieren und individuell an den Verlauf anzupassen und so günstig das Rezidivrisiko zu beeinflussen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Studiendesign**

Bei der vorliegenden Untersuchung handelt es sich um eine retrospektive Auswertung prospektiv im Rahmen der PTLD-1-Studie sowie des deutschen PTLD-Registers behandelter Patienten. Die Bestimmung des zellulären Immunstatus stellt bei Patienten mit PTLD eine Routineuntersuchung dar. Zusätzlich zu den Routineparametern wurden hier aus den Blutproben zur Immunstatusbestimmung auch die Zytokinplasmaspiegel von Interleukin 6, Interleukin 10 und TNF-alpha bestimmt. Die Veränderungen in Zytokinplasmaspiegeln und von Frequenzen der Lymphozytensubpopulationen über die Zeit wurden nach Abschluss der Datenerhebung mit linearen Regressionsmodellen mit dem klinischen Verlauf (Ansprechen auf die Therapie) der Patienten korreliert. Zytokinplasmaspiegel und Frequenzen von Lymphozytensubpopulationen bei Diagnosestellung der PTLD wurden mit einer frequenzgematchten Kontrollgruppe (s.u.) verglichen.

Die Messungen fanden über einem Zeitraum von 42 Monaten (von November 2005 bis Mai 2009) statt und erfolgten im Rahmen von Routinevorstellungen der Patienten während der Therapie oder im Rahmen der Nachsorge.

## **2.2 Patienten**

In die Studie wurden alle Patienten einbezogen, die in der PTLD-1 Studie oder innerhalb des Deutschen PTLD-Registers in der Klinik für Hämatologie und Onkologie der Charité, Campus Virchow-Klinikum, behandelt wurden und die bei der Studien- bzw. Registereinwilligung der wissenschaftlichen Verwendung biologischen Materials, welches nicht mehr für diagnostische Zwecke benötigt wurde, nicht widersprochen hatten.

Die PTLD-1-Studie wurde 2003 initiiert und ist eine prospektive longitudinale Phase II Studie zur Behandlung von Patienten mit CD20-positiver PTLD. Von 2003 bis 2006 sah das Studienprotokoll eine sequentielle Therapie mit 4 wöchentlichen Gaben des anti-CD20 Antikörpers Rituximab, gefolgt von 4 Zyklen Chemotherapie nach dem CHOP-21-Schema beginnend an Tag 50 vor. Bei Patienten mit Progress unter der Rituximab Monotherapie erfolgte die Chemotherapieeinleitung unmittelbar nach Sicherung der progredienten Erkrankung. Nach einem Sicherheitsamendment im Oktober 2006 sah das Studienprotokoll eine zusätzliche Risikostratifikation nach den ersten vier Gaben Rituximab vor: Patienten, die zu diesem Zeitpunkt bereits eine komplette Remission erreicht haben, erhielten statt Chemotherapie eine Fortsetzung der Rituximab-Monotherapie in dann 3-wöchentlichen Abständen (4 Gaben). Patienten, die keine komplette Remission erreicht haben wurden hingegen mit 4 Zyklen R-CHOP-21 statt 4 Zyklen CHOP-21 behandelt (5, 74).

Die PTLD-Register-Studie wurde im Dezember 2006 initiiert. Es handelt sich um eine nicht-intervenierende Beobachtungsstudie. Ziel der Registerstudie ist es, auch bei seltenen PTLD-Subtypen (z.B. CD20-negativer B-Zell PTLD, T-Zell-PTLD) und bei PTLD-Rezidiven detaillierte Erkenntnisse zur Effektivität und Tolerabilität der eingesetzten Behandlungsschemata zu gewinnen. Entsprechend der nicht-interventionellen Natur des Registers variieren die eingesetzten Behandlungsprotokolle deutlich. Die am häufigsten eingesetzten Erstlinientherapien sind Rituximab-Monotherapien, Bendamustin (+/- Rituximab) und CHOP-ähnliche Therapien (+/- Rituximab) wie CHOP-21 (Cyclophosphamid, Vincristin, Adriamycin, Prednisolon), ABVD (Adriamycin, Bleomycin, Vinblastin, DTIC) und VAD (Vincristin, Adriamycin, Dexamethason) mit und ohne Bestrahlung.

### **2.3 Diagnosesicherung und Staging**

Es wurden ausschließlich Patienten mit histologisch gesicherter PTLD eingeschlossen. Alle Gewebeproben wurden in einem Referenzzentrum für Lymphknotendiagnostik referenzpathologisch zweitbegutachtet und entsprechend der WHO-Klassifikation von 2001 eingeteilt.

Die Staginguntersuchungen bei Diagnosestellung beinhalteten neben der körperlichen Untersuchung bei allen Patienten eine Knochenmarkbiopsie, computertomographische Untersuchungen von Kopf, Hals, Thorax, Abdomen und Becken sowie laborchemische Untersuchung wie Blutbild, Serumelektrolyte, Leber- und Nierenfunktionswerte und LDH.

### **2.4 Beurteilung des Ansprechens und Follow-up**

Alle Patienten erhielten die gleichen Kontrolluntersuchungen, wenn auch die Behandlungsprotokolle der Patienten der PTLD-1-Studie und der der PTLD-Register-Studie unterschiedlich waren. Das Ansprechen auf die Therapie wurde dabei sowohl während der Behandlung (Interimstaging) als auch 4 Wochen nach Ende der Therapie (Abschlussstaging) beurteilt. Im Abschlussstaging erfolgte bei allen Patienten erneut eine Computertomographie von Hals, Thorax, Abdomen und Becken. Eine Knochenmarkbiopsie wurde nur durchgeführt, wenn initial ein Befall des Knochenmarks bestand. CT-morphologische Verlaufsuntersuchungen der initial involvierten Körperregionen erfolgten bei allen Patienten mindestens nach 6, 12, 18 und 24 Monaten nach Therapieende sowie nachfolgend mindestens 1-mal jährlich.

Das Therapieansprechen wurde entsprechend der WHO-Kriterien bewertet. Eine kompletten Remission (CR) wurde angenommen wenn jegliche klinische und morphologische Aktivität des/der Tumors/Tumore sich für mindestens vier Wochen vollständig zurückgebildet hatten. Eine partielle Remission (PR) war definiert als eine Reduktion der Tumormasse um mindestens 50% ohne Vorliegen der Kriterien der kompletten Remission und ohne Nachweis neu aufgetretener Lymphommanifestationen, wohingegen eine stabile Erkrankung (SD) angenommen wurde, wenn die Lymphomrückbildung weniger als 50% betrug oder aber die Targetläsionen um weniger als 25% an Größe zugenommen hatten, ohne dass dabei neue Manifestationen aufgetreten sein durften.

Bei einer Zunahme der Lymphommanifestationen um mehr als 25% gegenüber dem Nadir bzw. bei Auftreten neuer Manifestationen unter Therapie wurde von einer progredienten Erkrankung (PD) ausgegangen.

Patienten mit kompletter oder partieller Remission wurden als „Therapie-Ansprecher“ und Patienten mit stabiler oder progredienter Erkrankung als „Therapieversager“ zusammengefasst.

## **2.5 Bestimmung von IL-6, IL-10 und TNF-alpha Plasmaspiegeln**

Alle Zytokinmessungen wurden am Institut für Medizinische Immunologie des Charité, Campus Mitte, durchgeführt. Hierfür wurde das Immulite® Immunoassay-System (DPC Biermann, Bad Nauheim) entsprechend den Spezifikationen des Herstellers genutzt. Der minimale Nachweiswert für Interleukin-6 betrug 2 pg/ml, der minimale Nachweiswert für Interleukin-10 lag bei 5 pg/ml, der minimale Nachweiswert für TNF-alpha lag bei 1,7 pg/ml. Interleukin-10 und TNF-alpha wurden in heparinisiertem Plasma gemessen, Interleukin-6 in EDTA-Plasma.

## **2.6 Durchflusszytometrische Bestimmungen**

Die Quantifikation lymphozytärer Subpopulationen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden hierzu in EDTA-Plasma mit verschiedenfarbig fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD3, CD4, CD8, CD11a, CD16, CD19, CD28, CD57 und HLA-DR inkubiert und in Vierfarben-Technik mittels FACSCalibur™ analysiert. Die Analyse der Messungen erfolgte mit der CELLQuest™ Software (BD Biosciences).

## **2.7 Kontrollgruppe**

Die Kontrollgruppe zum Vergleich der Zytokinplasmalevel bei Diagnosestellung wurde in den Transplantationsambulanzen der Charité, Universitätsmedizin Berlin (CVK), rekrutiert. Die Auswahl der Kontrollpatienten erfolgte durch ein computergestütztes Frequenzmatching-Verfahren anhand der verfügbaren Basisparameter der Transplantationsdatenbanken. Dies bedeutet, dass nicht auf individuelle Patienten gematcht wurde, sondern lediglich die Häufigkeiten der Variablenverteilung innerhalb der beiden Gruppen gleich war. Matchingkriterien waren Alter, Geschlecht, transplantiertes Organ, die Zeitspanne von der Transplantation bis zur

Diagnosestellung (Patienten) bzw. Studieneinschluss (Kontrollen) sowie die Art der Immunsuppression (Substanzklassen).

## **2.8 Statistische Analysen**

Diskrete Variablen wurden, wenn möglich, mit dem Chi-Quadrat-Test, sonst mit dem Fisher's exact Test verglichen. Diskrete Variable sind in Zahlen überführte qualitative Merkmale, so z.B. Geschlecht, das transplantierte Organ, das eingenommene immunsupprimierende Medikament (siehe Tabelle 4). Kontinuierliche Variablen der Patientencharakteristika wie z.B. Alter, Zeit von Transplantation bis Blutabnahme und die Zytokin-Plasmaspiegel bei Erstdiagnose der PTLD wurden mittels  $t$ -Test für unabhängige Stichproben nach vorheriger Prüfung auf Gleichheit der Varianzen verglichen.

Die Veränderung der Zytokinplasmaspiegel im zeitlichen Verlauf ab Diagnosestellung wurde mittels gemischter Effektmodelle analysiert. Hierbei handelt es sich um (lineare) Regressionsmodelle, die die Möglichkeit bieten, den Einfluss verschiedener unabhängiger Variablen auf eine abhängige Variable gleichzeitig zu untersuchen und dabei die Art und Intensität des Einflusses einer Kovariaten zu quantifizieren. Darüber hinaus erlauben diese Modelle die Möglichkeit intra- und interindividueller Variabilität. Neben der Zeit seit Diagnosestellung wurden als Kovariaten der Interleukin-6-, Interleukin-10- und TNF-alpha-Spiegel, das Ansprechen auf die applizierte Erstlinientherapie (CR/PR versus SD/PD), das Vorliegen einer EBV-Assoziation der PTLD (positiv versus negativ), der Nachweis von EBV-DNA im peripheren Blut (positiv versus negativ), die Verwendung von Rituximab (ja/nein) und die Verwendung CHOP-ähnlicher Chemotherapie (ja/nein) berücksichtigt. Kovariaten wie z.B. Alter, Geschlecht, die Verwendung bestimmter Immunsuppressiva und andere wurden als zusätzliche Kovariaten zugelassen, wenn sich hierdurch die Anpassung der modellierten Zytokinwerte an die beobachtete Werte verbesserte. Zur Bestimmung der minimalen Anzahl von Kovariaten, die eine möglichst hohe Übereinstimmung der modellierten mit den beobachteten Werte erlaubte, wurden Modellreduktionen mittels Log-Likelihood-Testen (s.u.) durchgeführt. In allen Modellen wurde angenommen, dass eine Interaktion unter den Kovariaten bestehen kann, d.h. z.B., dass sich die zeitlichen Verläufe in den Ansprechgruppen unterscheiden können und dass die EBV-Assoziation der PTLD die Ansprechwahrscheinlichkeit beeinflusst. Zur Abbildung der

intra- und interindividuellen Variabilität von Messwerten wurden zufällige Effekte des Achsenabschnitts, d.h. eine Streuung der Ausgangswerte bei Diagnosestellung und zufällige Effekte der Zeit, d.h. verschiedenartige Verläufe bei unterschiedlichen Patienten, zugelassen.

Likelihood-Verhältnistests bewerten den Nutzen zusätzlicher Variablen in ansonsten gleichen Modellen. Hierbei wird das neue/erweiterte Modell mit dem restringierten, die neue Variable nicht umfassenden Modell, verglichen und geprüft, ob das restringierte Modell die gleiche Aussagekraft besitzt wie das unrestringierte. Auf diese Weise kann das Modell mit der besten Übereinstimmung der gesammelten Daten und der geringsten Befundvariabilität bestimmt werden. Neue Variablen können bei relevantem Einfluss auf die abhängige Variable das Modell verbessern und die Übereinstimmung mit den beobachteten Werte erhöhen oder aber durch Erhöhung der Variabilität des Modells die Übereinstimmung mit den gesammelten Daten verschlechtern.

Regressionskoeffizienten wurden zusammen mit der geschätzten Standardabweichung berechnet. Signifikanz wurde angenommen bei einem  $p < 0.05$ . Die statistischen Berechnungen erfolgten mittels SPSS 16.0 (SAS Institut GmbH, Heidelberg) und R 2.92 (R Foundation for Statistical Computing, 2010).

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Patientencharakteristik**

In die vorliegende Studie wurden insgesamt 38 Patienten mit einer PTLD und 42 transplantierte Patienten ohne PTLD als Kontrollen eingeschlossen.

Folgende Organe waren bei den Patienten mit PTLD transplantiert worden:

- Niere (15 Patienten)
- Leber (13 Patienten)
- Lunge (1 Patient)
- kombinierte Transplantation (Herz/Lunge, Herz/Niere, Herz/Leber, Niere/Bauchspeicheldrüse: 9 Patienten)

Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 53.6 Jahre.

Die überwiegende Mehrzahl der in dieser Studie untersuchten PTLDs waren sogenannte „späte“ PTLDs (35 von 38 Patienten, 92%), die im Gegensatz zu den „frühen“ PTLDs jenseits des ersten Jahres nach Transplantation auftraten. Späte PTLDs haben in der Regel eine aggressive monomorphe Histologie und bei Diagnosestellung bereits ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium. Am häufigsten lag in der analysierten Patientenpopulation ein diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL) vor. Bei 3 Patienten war ein Hodgkin- oder Hodgkin-ähnliches Lymphom, bei einem Patient ein angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom, bei einem eine Plasmozytom-ähnliche Läsion und bei einem ein CD20-negatives plasmablastisches Lymphom (PBL) diagnostiziert worden. 5 Patienten hatten verschiedene CD20-positive B-Zell-PTLD-Subtypen, die der Subgruppe der indolenten Lymphome zugeordnet werden können (Tabelle 3).

Die immunsuppressive Therapie enthielt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei 86% der Patienten einen Calcineurininhibitor (39% erhielten Cyclosporin A, 47% erhielten FK506). 1% der Patienten erhielt einen mTOR- (mammalian Target Of Rapamycin) Inhibitor. 31% der Patienten erhielten zusätzlich MMF und 31% der Patienten erhielten zusätzlich Azathioprin. 50% erhielten im Rahmen der immunsuppressiven Therapie ein Steroid in verschiedenen Dosierungen (insgesamt 34% in niedriger Dosierung, das heißt maximal 5mg/Tag, und jeweils 8% der Patienten erhielten maximal 10mg/Tag bzw. mehr als 10mg/Tag) (Tabelle 4).

Als erste therapeutische Maßnahme wurde nach der Diagnose der PTLD bei allen Patienten die Immunsuppression reduziert. Bei unzureichendem Effekt dieser therapeutischen Intervention wurden die Patienten entsprechend der Voraussetzungen entweder in die PTLD-1 Studie zur Erstlinientherapie der CD20-positiven PTLD aufgenommen oder in das PTLD-Register eingeschlossen. Von den 38 untersuchten Patienten waren insgesamt 27 Patienten in die PTLD-1-Studie eingeschlossen worden. 11 Patienten waren innerhalb des PTLD-Registers behandelt worden.

Von den 27 an der PTLD-1-Studie teilnehmenden Patienten hatten 10 Patienten bereits nach den ersten vier Zyklen Rituximab eine komplette Remission erreicht und erhielten daraufhin vier weitere Zyklen Rituximab-Monotherapie in 3-wöchentlichem

Abstand. 17 Patienten hatten lediglich eine partielle Remission erreicht oder zeigten eine stabile oder gar progrediente Erkrankung und erhielten dementsprechend protokollgemäß 4 Zyklen R-CHOP-21 (siehe Studienprotokoll PTLD-1-Studie, Seite 16).

Die Patienten der PTLD-Registerstudie wurden uneinheitlich behandelt. Zwei der drei Patienten mit Hodgkin-PTLD erhielten zwei Zyklen ABVD (=Adriamycin, Bleomycin, Vinblastin, Dacarbazin) in folgender Dosierung:

Adriamycin	25mg/m <sup>2</sup> an Tag 1 und Tag 15
Bleomycin	10 mg/m <sup>2</sup> an Tag 1 und Tag 15
Vinblastin	6 mg/m <sup>2</sup> an Tag 1 und Tag 15
Decarbazin	375 mg/m <sup>2</sup> an Tag 1 und Tag 15

Der Patient mit isoliertem inguinalem Befall bei Hodgkin-PTLD erhielt eine primäre Radiatio der betroffenen Region. Der Patient mit dem angioimmunoblastischen T-Zell-Lymphom erhielt eine Therapie mit CHOP-21, der Patient mit plasmozytom-ähnlicher PTLD eine Therapie mit Vincristin, Adriamycin und Dexamethason (VAD) in folgender Dosierung:

Vincristin	0,4 mg/m <sup>2</sup> an Tag 1 bis Tag 4
Adriamycin	9 mg/m <sup>2</sup> an Tag 1 bis Tag 4
Dexamethason	40 mg/m <sup>2</sup> an Tag 1 bis Tag 4 sowie Tag 9-12 und Tag 17-21.

Der Patient mit plasmoblastischem Lymphom verstarb in einem weit fortgeschrittenen Krankheitsstadium noch bevor eine Therapie initiiert werden konnte. Die 5 Patienten mit indolenten CD20-positiven B-Zell-Lymphomen erhielten entweder eine Rituximab Monotherapie oder (falls eine komplette Remission verfehlt wurde) zusätzlich noch eine CHOP-basierte Chemotherapie bzw. eine Chemotherapie mit Bendamustin (je ein Patient, jeweils 90 mg /m<sup>2</sup> Bendamustin an Tag 1 und 2) (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3: Therapieschemata der Patienten des PTLD-Registers**

Diagnose	Patienten	Therapie
Hodgkin-PTLD	3 Patienten, davon 2 1	zwei Zyklen ABVD primäre Radiatio
Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom	1	CHOP- 21
Plasmozytom-ähnliche PTLD	1	VAD
Plasmablastisches Lymphom	1	verstorben vor Einleitung einer Therapie
CD20-positives B-Zell-Lymphom	5 Patienten, davon 3 1 1	Rituximab Monotherapie Rituximab+CHOP Rituximab+Bendamustin

### **3.2 Vergleich der Patienten- mit der Kontrollgruppe**

Die Kontrollgruppe umfasste 42 Patienten. Diese waren im Durchschnitt gleich alt wie die Patienten mit PTLD (durchschnittliches Alter 52.6 versus 53.6 Jahre,  $p=0.630$ ). Auch in der Geschlechtsverteilung gab es keine signifikanten Unterschiede ( $p=0.814$ ). 18 der 42 Kontrollpatienten (43%) waren nierentransplantiert (PTLD-Patienten: 39%), 18 (44%) lebertransplantiert (PTLD-Patienten: 34%), jeweils ein Kontroll- und ein PTLD-Patient lungentransplantiert (2% bzw. 3%). 5 Kontrollpatienten (12%) und 9 PTLD-Patienten (24%) hatten mehr als ein Transplantat erhalten (kombinierte Transplantationen). Die letzte Transplantation lag in der Kontrollgruppe durchschnittlich 7.3 Jahre zurück, bei den PTLD-Patienten durchschnittlich 9.3 Jahre. Entsprechend des initial erfolgten Frequenzmatchings bestanden auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der immunsuppressiven Medikation – weder in den Häufigkeiten der eingesetzten Substanzen, noch in den mittleren verwendeten Dosen (Tabelle 4). Insgesamt 79% der Kontrollpatienten erhielten als Immunsuppressivum einen Calcineurininhibitor (36% erhielten Cyclosporin A, 43% erhielten FK506). In der Gruppe der PTLD-Patienten waren dies 86% (39% Cyclosporin A, 47% FK506). Einen mTOR-Hemmer erhielten 12% der Kontrollpatienten und 3% der PTLD-Patienten. Als Proliferationshemmer erhielten 45% der Kontroll-Patienten MMF und 21% Azathioprin. In der Gruppe der Patienten mit PTLD waren dies jeweils 31%. 57% bzw. 50% der Patienten erhielten

bei Studieneinschluss zusätzlich ein Steroid. Zusammengefasst bestanden somit keine relevanten Unterschiede in der Basischarakteristik zwischen Patienten mit PTLD und dem ausgewählten Kontrollkollektiv.

**Tabelle 4: Patientencharakteristik und Basischarakteristika der Kontrollgruppe**

	<b>PTLD (N=38)</b>	<b>Kontrollen (N=42)</b>	
<b>Alter in Jahren (Durchschnitt, Spanne)</b>	53.6 (19-82)	52.6 (31-75)	p=0.630 <sup>*</sup>
<b>Geschlecht (M/F)</b>	25/13 (66%)	29/13 (69%)	p=0.814 <sup>#</sup>
<b>Transplantiertes Organ:</b>			
<i>Niere</i>	15 (39%)	18 (43%)	p=0.570 <sup>§</sup>
<i>Leber</i>	13 (34%)	18 (43%)	
<i>Lunge</i>	1 (3%)	1 (2%)	
<i>Kombinierte Transplantate</i>	9 (24%)	5 (12%)	
Frühere Transplantationen	2/38 (5%)	2/42 (5%)	p=1.000 <sup>#</sup>
<b>Zugrunde liegende Krankheit: Autoimmunkrankheiten<sup>+</sup></b>	8/38 (21%)	8/42 (19%)	p=1.000 <sup>#</sup>
<b>Zeit seit der letzten Transplantation bis zum Studieneintritt (Durchschnitt, Spanne)</b>	9.3 Jahre (0.2-22)	7.3 Jahre (0.2-21.5)	p=0.142 <sup>*</sup>
<b>Immunsuppression bei Studieneintritt</b>			
<i>CNI</i>	33/38 (87%)	33/42 (79%)	p=1.000 <sup>#</sup>
<i>CyA</i>	15/38 (39%)	15/42 (36%)	p=0.092 <sup>#</sup>
<i>Durchschnittlicher CyA Plasmaspiegel</i>	130.8 ng/ml	138.2 ng/ml	p=0.793 <sup>*</sup>
<i>FK</i>	18/38 (47%)	18/42 (43%)	p=0.113 <sup>*</sup>
<i>Durchschnittlicher FK Plasmaspiegel</i>	7.49 ng/ml	7.19 ng/ml	p=0.760 <sup>*</sup>
<i>mTOR</i>	1/38 (3%)	5/42 (12%)	p=0.436 <sup>#</sup>
<i>Durchschnittliche mTOR Dosis</i>	2.0 mg/Tag	1.8 mg/Tag	p=0.704 <sup>*</sup>
<i>MMF</i>	12/38 (31%)	19/42 (45%)	p=0.254 <sup>#</sup>
<i>Durchschnittliche MMF Dosis</i>	1282 mg/Tag	1566 mg/Tag	p=0.148 <sup>*</sup>
<i>AZA</i>	12/38 (31%)	9/42 (21%)	p=0.322 <sup>#</sup>
<i>Durchschnittliche AZA Dosis</i>	69 mg/Tag	35 mg/Tag	p=0.023 <sup>*</sup>
<i>Steroide</i>	19/38 (50%)	24/42 (57%)	p=0.654 <sup>#</sup>
<i>Durchschnittliche Steroid- Dosis</i>	6.7 mg/Tag	5.0 mg/Tag	p=0.079 <sup>*</sup>
<i>Niedrig dosierte Steroide: ≤5mg</i>	13/38 (34%)	21/42 (50%)	p=0.179 <sup>*</sup>
<i>Hoch dosierte Steroide: 5.1-10mg</i>	4/38 (11%)	2/42 (5%)	p=0.416 <sup>*</sup>
<i>Hoch dosierte Steroide: &gt;10mg</i>	2/38 (5%)	1/42 (2%)	p=0.602 <sup>*</sup>

<sup>+</sup>Folgende Autoimmunkrankheiten wurden eingeschlossen: Autoimmune Glomerulonephritis, Autoimmune Hepatitis, primäre biliäre Zirrhose (PBC), primäre sklerosierende Cholangitis (PSC);

<sup>\*</sup>t-test, <sup>#</sup>Fisher's exact test, <sup>§</sup> $\chi^2$ -test,

### **3.3 Plasmaspiegel von IL-6, IL-10 und TNF-alpha zum Zeitpunkt der PTLD-Diagnose**

In der Gruppe der therapierefraktären Patienten wurden insgesamt 34 Untersuchungen durchgeführt. Dies entspricht durchschnittlichen Untersuchungen in 12-tägigen Abständen. In der Gruppe der therapiesensiblen Patienten wurden insgesamt 146 Untersuchungen durchgeführt, was 40.5-tägigen Abständen in der Therapiephase und 111-tägigen Abständen in der Nachbeobachtungszeit entspricht.

Um zu identifizieren, ob sich die Plasmaspiegel von Interleukin-6, Interleukin-10 und TNF-alpha bei Patienten mit PTLD signifikant von denen ohne PTLD unterscheiden, wurde bei allen Patienten mit PTLD zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der Plasmaspiegel dieser Zytokine bestimmt, und die Werte wurden mit denen der Kontrollpatienten verglichen. Außerdem wurden die Ausgangsplasmaspiegel von therapiesensiblen mit therapierefraktären Patienten verglichen.

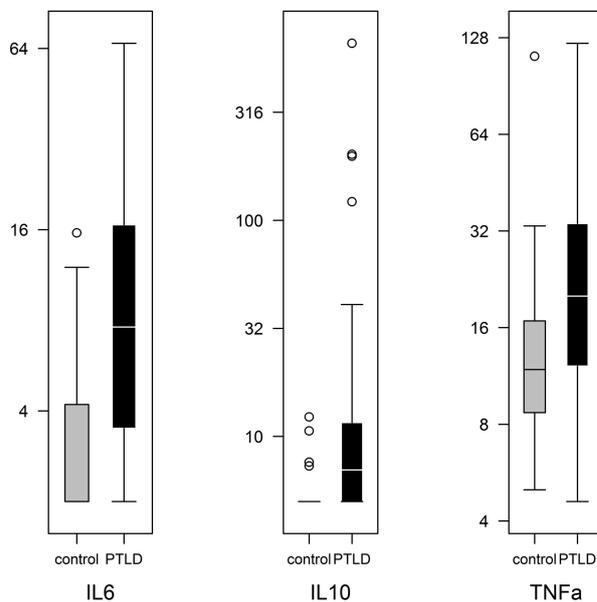
Die durchschnittlichen Interleukin-6-Plasmaspiegel waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei den PTLD-Patienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen signifikant erhöht (13.8 pg/ml vs. 3.8 pg/ml,  $p < 0.004$ , siehe Box-Plot-Darstellung in Bild 1). Zwischen den therapiesensiblen und therapierefraktären Patienten zeigte sich jedoch kein Unterschied in der initialen (prätherapeutischen) Höhe der Interleukin-6-Plasmaspiegeln ( $p = 0.232$ ).

Die prätherapeutischen Interleukin-10-Plasmaspiegel waren bei den PTLD-Patienten ebenfalls signifikant höher als bei Patienten ohne PTLD (54.7 pg/ml vs. 5.4 pg/ml,  $p < 0.001$ , siehe Bild 1). Überdies gab es bei den Interleukin-10-Plasmaspiegeln im Gegensatz zum Interleukin-6 einen signifikanten Unterschied zwischen den später therapiesensiblen und den therapierefraktären Patienten. So waren bei den späteren Ansprechern die Interleukin-10-Spiegel signifikant höher als bei den späteren Nichtansprechern (116 pg/ml vs. 14 pg/ml).

Die TNF-alpha-Spiegel zeigten zum Diagnosezeitpunkt weniger ausgeprägte Unterschiede. Bei den PTLD-Patienten betragen die prätherapeutischen TNF-alpha-Spiegel durchschnittlich 27.7 pg/ml, bei den gesunden Kontrollpersonen 16.0 pg/ml. Dennoch erreicht dieser Unterschied eine statistische Signifikanz ( $p < 0.004$ ). Es

zeigten sich keine Unterschiede zwischen TNF-alpha-Spiegeln therapiesensibler bzw. therapierefraktärer Patienten (Bild1).

**Bild 1: Zytokinplasmaspiegel bei PTLD-Patienten zum Diagnosezeitpunkt**



**Bild 1:** Zytokinplasmaspiegel bei PTLD-Patienten zum Diagnosezeitpunkt. PTLD-Patienten haben signifikant erhöhte durchschnittliche Interleukin-6 (IL6) Spiegel: 13.8 pg/ml versus 3.8 pg/ml, Interleukin-10 (IL10) Spiegel: 54.7 pg/ml versus 5.4 pg/ml und TNF-alpha (TNFa) Spiegel: 27.7 pg/ml versus 16.0 pg/ml.

### 3.4 Vergleich der Patientencharakteristik von therapiesensiblen und therapierefraktären Patienten

Sowohl die initiale Immunsuppression als auch die Behandlungsregime unterschieden sich nicht zwischen Patienten, die auf die gewählte Therapie angesprochen haben und solchen die auf diese Therapie refraktär waren. Auch ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Immunsuppression nach Diagnosestellung der PTLD, bezüglich des histologischen Subtyps, des Krankheitsstadiums (entsprechend Ann-Arbor-Klassifikation) und in der Gegenwart von EBV-DNA im peripheren Blut. In Tabelle 5 sind die initiale Immunsuppression, die Immunsuppression nach erfolgte Reduktion, der histologische PTLD-Subtyp, die EBV-Assoziation der PTLD, die EBV-Viruslast im peripheren Blut (positiv/negativ) und das Krankheitsstadium zusammengefasst: Lediglich bei der EBV-Assoziation der PTLD war ein signifikanter Unterschied zu erkennen. So waren 8 von 9 therapierefraktären Patienten an einer EBV-assoziierten PTLD erkrankt, aber nur 9 von 20 der therapiesensiblen Patienten ( $p=0.005$ ).

In der Gruppe der therapierefraktären Patienten hatten 5 von 9 Patienten eine Therapie mit Rituximab erhalten (56%). In der Gruppe der therapiesensiblen waren dies 25 von 29 Patienten (86%). 8 der 9 (89%) therapierefraktären Patienten hatten eine Chemotherapie erhalten (CHOP oder CHOP-ähnlich) wobei dies in der Gruppe der therapiesensiblen Patienten nur 16 von 29 Patienten waren (55%). Im Median wurden zwei bzw. vier Chemotherapie-Zyklen in den beiden Gruppen appliziert. Diese (nicht signifikanten) Unterschiede spiegeln das Prinzip der zurückhaltenden Indikation von Chemotherapie bei Patienten mit PTLD wider, wenn diese auf eine Monotherapie mit Rituximab ein befriedigendes Ansprechen zeigen. In der Gruppe der Therapieversager befand sich allerdings auch ein Patient, der bis auf die Reduktion der Immunsuppression keine weitere Therapie erhalten hatte. Dies war auf eine rasch progrediente Erkrankung zurückzuführen (Tod vor Therapieeinleitung).

In der Gruppe der therapiesensiblen Patienten erreichten 27 der 38 Patienten nach der Erstlinientherapie eine komplette Remission. Zwei erreichten unter der Erstlinientherapie lediglich eine partielle Remission, blieben im weiteren Verlauf aber progressionsfrei. Zwei der Patienten in kompletter Remission erlitten im weiteren Verlauf ein Rezidiv ihrer Erkrankung. Für die Auswertung der Korrelation von Zytokinplasmaspiegeln und T-Zell-Subpopulationen mit dem Therapieansprechen wurden diese beiden Patienten mit dem Zeitpunkt der letzten sicheren kompletten Remission zensiert.

In der Gruppe der therapierefraktären Patienten (9 Patienten) sprachen 8 nicht auf die initiale und nachfolgende Therapien an und verstarben im kurzfristigen Verlauf. Nur ein Patient profitierte von einer Salvagetherapie. Für die Auswertung der Korrelation von Zytokinplasmaspiegeln und T-Zell-Subpopulationen mit dem Therapieansprechen wurde dieser Patienten mit dem Zeitpunkt der Einleitung einer nachgewiesenen effektiven Salvagetherapie zensiert.

Die Therapiezeit betrug bei vollständig durchgeführter Therapie bis zu 120 Tage. Danach begann die Nachbeobachtungsphase. Aus dem oben genannten ergibt sich, dass keiner der therapierefraktären Patienten die Nachbeobachtungsphase erreichte. Somit war die effektive Beobachtungszeit in der Gruppe der therapierefraktären Patienten kürzer und betrug 46 Tage. In der Gruppe der therapiesensiblen Patienten

betrug die gesamte Beobachtungszeit, die sich aus der Therapiezeit und Nachbeobachtungszeit zusammensetzt, median 204 Tage.

**Tabelle 5: Charakteristik therapierefraktärer und therapiesensibler Patienten**

	<b>Therapierefraktäre Patienten (N=9)</b>	<b>Therapiesensible Patienten (N=29)</b>	
<b>Zugrunde liegende Krankheit: Autoimmunkrankheit</b> (GN, autoimmune Hepatitis, PSC, PBC)	2/9 (22%)	6/29 (21%)	p=1.000 <sup>#</sup>
<b>Frühere Transplantationen</b>	1/9 (11%)	1/29 (3%)	p=1.000 <sup>#</sup>
<b>Zeit seit der Transplantation bis zur PTLD</b> (früh versus spät)	1/8	2/27	p=0.682 <sup>#</sup>
<b>Immunsuppressive Behandlung bei der PTLD- Diagnose</b>			
CyA	3/9 (33%)	12/29 (41%)	p=1.000 <sup>#</sup>
durchschnittliche CyA Plasmaspiegel	112 ng/ml	136 ng/ml	p=0.468*
FK	6/9 (67%)	12/29 (41%)	p=0.260 <sup>#</sup>
durchschnittliche FK Plasmaspiegel	9.4 ng/ml	6.3 ng/ml	p=0.061*
mTOR Inhibitor	0/9 (0%)	1/29 (3%)	p=1.000 <sup>#</sup>
MMF	2/9 (22%)	10/29 (34%)	p=0.689 <sup>#</sup>
durchschnittliche MMF Dosis	1500 mg/Tag	1238 mg/Tag	p=0.582*
AZA	3/9 (33%)	9/29 (31%)	p=1.000 <sup>#</sup>
durchschnittliche AZA Dosis	58 mg/Tag	72 mg/Tag	p=0.583*
Steroide	4/9 (44%)	15/29 (52%)	p=1.000 <sup>#</sup>
Niedrig dosierte Steroide: ≤5mg	1/9 (11%)	12/29 (44%)	p=0.126 <sup>#</sup>
Hoch dosierte Steroide: 5.1-10mg	2/9 (22%)	1/29 (3%)	p=0.134 <sup>#</sup>
Hoch dosierte Steroide: >10mg	1/9 (11%)	2/29 (7%)	p=0.134 <sup>#</sup>
durchschnittliche Steroid-Dosis	7.5 mg/Tag	6.7 mg/Tag	p=0.750*
<b>Immunsuppressive Therapie nach der Reduktion der Immunsuppression</b>			
CyA	3/9 (67%)	10/29 (34%)	p=1.000 <sup>#</sup>
durchschnittliche CyA Plasmaspiegel	158 ng/ml	160 ng/ml	p=0.980*
FK	4/9 (44%)	12/29 (41%)	p=1.000 <sup>#</sup>
durchschnittliche FK Plasmaspiegel	5.4 ng/ml	5.1 ng/ml	p=0.862*
mTOR Inhibitor	1/9 (11%)	2/29 (7%)	p=1.000 <sup>#</sup>
durchschnittliche mTOR Dosis	3.0 mg/Tag	2.8 mg/Tag	p=0.946*
MMF	1/9 (11%)	10/29 (34%)	p=0.237 <sup>#</sup>
durchschnittliche MMF Dosis	1000 mg/Tag	1013 mg/Tag	p=0.977*
AZA	0/9 (0%)	2/29 (7%)	p=1.000 <sup>#</sup>
durchschnittliche AZA Dosis	-	50 mg/Tag	-
Steroide	3/9 (33%)	15/29 (52%)	p=0.454 <sup>#</sup>
Niedrig dosierte Steroide: ≤5mg	2/9 (22%)	13/29 (45%)	p=0.273 <sup>#</sup>
Hoch dosierte Steroide: 5.1-10mg	1/9 (11%)	0/29 (0%)	p=0.237 <sup>#</sup>
Hoch dosierte Steroide: >10mg	0/9 (0%)	2/29 (7%)	p=1.000 <sup>#</sup>
durchschnittliche Steroid-Dosis	9.2 mg/Tag	6.5 mg/Tag	p=0.454*

**Fortsetzung Tabelle 5:**

	<b>Therapierefraktäre Patienten (N=9)</b>	<b>Therapiesensible Patienten (N=29)</b>	
<b>Histologie der PTLD</b>			
Polymorphe B-Zell PTLD	2 (22%)	3 (10%)	p=0.472 <sup>§</sup>
Monomorphe B-Zell PTLD	6 (68%)	26 (90%)	
<i>Burkitt PTLD</i>	0/6	2/26	
<i>Diffus großzellige (DLBCL) PTLD</i>	5/6	16/26	
<i>Hodgkin PTLD</i>	1/6	2/26	
<i>Plasmozytom-ähnliche PTLD</i>	0/6	1/26	
<i>Andere B-Zell PTLD</i>	0/6	5/26	
T-Zell PTLD	1 (11%)	0 (0%)	
<b>EBV-Serologie</b> Erstinfektion/Reaktivierung	1/8	0/29	p=0.237 <sup>#</sup>
<b>EBV-Assoziation der PTLD</b> positiv/negativ	8/1	9/20	<b>p=0.005<sup>#</sup></b>
<b>Periphere EBV-DNA- Last</b> positiv/negativ	8/1	15/14	p=0.061 <sup>#</sup>
<b>Periphere EBV-DNA- Last</b> Median (25%-;75%-Perzentile) in Kopien/ml	1100 (0;70.500)	0 (0;4500)	p=0.117 <sup>+</sup>
<b>Ann Arbor Stadium</b> Begrenzte versus fortgeschrittene Krankheit	3/6	11/18	p=0.359 <sup>#</sup>
<b>LDH</b> Median, (25%-;75%-Perzentile) in U/ml	339 (258-998)	209 (181-270)	<b>p=0.002<sup>+</sup></b>
<b>Behandlungsprotokoll inklusive Rituximab</b>	5/9 (56%)	25/29 (86%)	p=0.071 <sup>#</sup>
<b>Behandlungsprotokoll inklusive Chemotherapie</b>	8/9 (89%)	16/29 (55%)	p=0.115 <sup>#</sup>

<sup>+</sup> Mann Whitney-test, <sup>#</sup> Fisher's exact test, <sup>§</sup>  $\chi^2$ -test

### **3.5 Verlauf der Zytokinspiegel von therapiesensiblen und terapierefraktären Patienten**

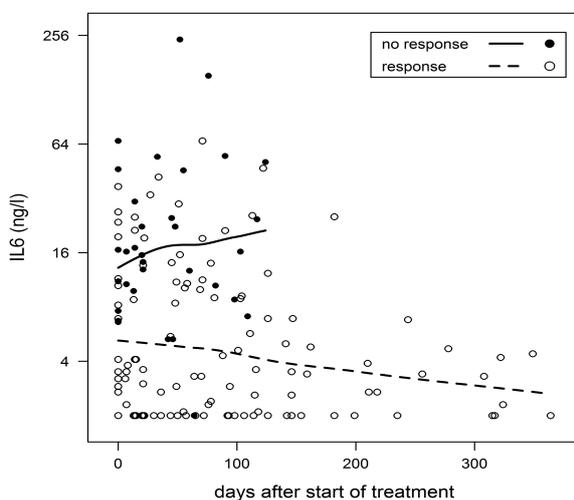
Um die Unterschiede der Plasmaspiegel von Interleukin-6, Interleukin-10 und TNF-alpha in den verschiedenen Patientengruppen über die Zeit zu erfassen, wurde ein gemischtes lineares Regressionsmodell verwendet. Hierbei wurde angenommen, dass 1. die Zytokinplasmaspiegel sich über die Zeit verändern, dass 2. die Ausgangswerte in den beiden Gruppen unterschiedlich sein könnten und dass 3. eine Interaktion zwischen diesen beiden Variablen existieren könnte, das heißt, dass der Verlauf der Zytokinspiegel in den Gruppen der terapierefraktären und therapiesensiblen Patienten unterschiedlich ist. Daneben wurde zufällige Einflussgrößen erlaubt und verschiedene Kofaktoren berücksichtigt (EBV-Assoziation

der PTLD, Nachweis von EBV-DNA im peripheren Blut, Art der applizierten Therapie (Rituximab/Chemotherapie), Erkrankungsstadium, histologische Subtyp (polymorph, monomorph), Geschlecht, Alter, Zeit von Transplantation bis zur Diagnose). Aus den verschiedenen Modellen wurde mittels Likelihood-Ratio-Tests dasjenige ausgewählt, welches mit möglichst wenig Kovariablen (Kofaktoren) die beste Anpassung an die beobachteten Daten zeigte. Dies war das Modell, das lediglich die festen Einflussfaktoren „Zeit ab PTLD-Diagnose“, „Ansprechen auf die Therapie“ und eine Interaktion der beiden Effekte enthielt.

### Interleukin-6:

Die Lösung der Effektmodelle für feste Effekte (Zeit, Therapieansprechen, Interaktion) für die verschiedenen analysierten Interleukine zeigte 1.: eine signifikante Abnahme der Interleukin-6-Plasmaspiegel bei Patienten, die auf die PTLD-Behandlung ansprachen ( $p < 0.001$ ) und 2.: eine signifikante Zunahme bei denjenigen Patienten, die dies nicht taten ( $p < 0.001$ , Bild 2a und Tabelle 6).

**Bild 2a: Interleukin-6-Plasmaspiegel von PTLD-Patienten während der Therapie.**



**Bild 2a:** Interleukin-6-Plasmaspiegel von PTLD-Patienten während der Therapie. Ausgefüllte Kreise stehen für die Spiegel der Patienten, die nicht auf die Therapie ansprachen, offene Kreise für die ansprechenden. Die jeweiligen Linien zeigen den errechneten durchschnittlichen Verlauf des IL6-Plasmaspiegels für die beiden Patientengruppen an. Bei den auf die Therapie ansprechenden Patienten sinken die zu Therapiebeginn erhöhten IL6-Werte, bei den nicht auf die Therapie ansprechenden Patienten steigen sie an. Dieser unterschiedliche Verlauf ist signifikant, die verschiedenen Ausgangswerte der beiden Patientengruppen jedoch nicht.

Die Interleukin-6-Zytokinspiegel waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nicht signifikant unterschiedlich ( $p = 0.172$ , Tabelle 6).

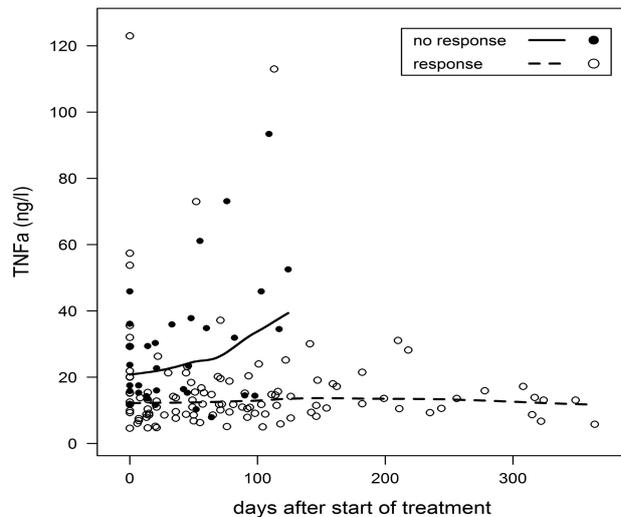
### TNF-alpha:

Für die TNF-alpha-Plasmaspiegel zeigten sich ebenfalls signifikant unterschiedliche Verläufe zwischen den Gruppen der therapiesensiblen und therapierefraktären Patienten. Bei den Patienten, die auf die PTLD-Therapie ansprachen, zeigten sich über den gesamten Zeitverlauf konsistent niedrige Plasmaspiegel ( $p < 0.001$ , Bild 2b und Tabelle 6), jedoch fanden sich stark ansteigende TNF-alpha-Plasmaspiegel bei nicht auf die Therapie ansprechenden Patienten. Die Ausgangswerte waren in beiden Gruppen nicht unterschiedlich ( $p = 0.714$ , Tabelle 6)

**Tabelle 6: Gemischtes lineares Regressionsmodell der Zytokinspiegel**

Zytokinplasmaspiegel ~ Therapieansprechen x Zeit (Feste Effekte)			
<b>IL-6</b>	<b>Wert</b>	<b>Standardabweichung (SE)</b>	<b>P</b>
Ausgangswert (pg/ml)	+17.760	5.922	<b>0.005</b>
$\Delta$ Ausgangswert therapiesensibler Patienten (pg/ml)	-8.928	6.503	0.172
Veränderung im Verlauf der Zeit (pg/ml/Tag)	+0.316	0.097	<b>0.001</b>
$\Delta$ Veränderung im Verlauf der Zeit bei therapiesensiblen Patienten (pg/ml/Tag)#	-0.318	0.097	<b>0.001</b>
<b>TNFa</b>	<b>Value</b>	<b>SE</b>	<b>P</b>
Ausgangswert (pg/ml)	+17.931	5.441	<b>0.002</b>
$\Delta$ Ausgangswert therapiesensibler Patienten (pg/ml)	+2.296	6.251	0.714
Veränderung im Verlauf der Zeit (pg/ml/Tag)	+0.234	0.062	<b>&lt;0.001</b>
$\Delta$ Veränderung im Verlauf der Zeit bei therapiesensiblen Patienten (pg/ml/Tag)#	-0.236	0.062	<b>&lt;0.001</b>
<b>IL-10</b>	<b>Value</b>	<b>SE</b>	<b>P</b>
Ausgangswert (pg/ml)	+88.360	33.010	<b>0.001</b>
$\Delta$ Ausgangswert therapiesensibler Patienten (pg/ml)	-76.334	38.268	<b>0.048</b>
Veränderung im Verlauf der Zeit (pg/ml/Tag)	-0.047	0.141	0.734
$\Delta$ Veränderung im Verlauf der Zeit bei therapiesensiblen Patienten (pg/ml/Tag)#	+0.039	0.141	0.783

## Bild 2b: TNF-alpha-Plasmaspiegel von PTLD-Patienten während der Therapie



**Bild 2b:** Legende wie bei Bild 2a. Die TNF $\alpha$ -Plasmaspiegel bleiben bei den auf die Therapie ansprechenden Patienten stabil, wohingegen die nicht auf die Therapie ansprechenden Patienten einen signifikanten Anstieg der Spiegel aufweisen ( $p < 0.001$ ). Die Ausgangswerte von TNF $\alpha$  waren bei den beiden Patientengruppen nicht signifikant verschieden. Die durchschnittliche Beobachtungszeit nach Therapiebeginn ist bei den nicht auf die Therapie ansprechenden Patienten signifikant kürzer als bei den auf die Therapie ansprechenden (46 Tage versus 204 Tage). Dies kommt durch eine höhere Mortalität bei den Patienten zustande, die nicht auf eine 1st-line-Therapie ansprechen.

### Interleukin-10:

Die Interleukin-10-Plasmaspiegel zeigten keine signifikant unterschiedlichen Verläufe zwischen therapiesensiblen und therapieresistenten Patienten ( $p = 0.734$ ) und auch insgesamt nur geringe Veränderungen während der Therapie ( $0.05 \text{ pg/Tag}$ ,  $p = 0.734$ ). Allerdings bestanden erhebliche Unterschiede in den Ausgangswerten zwischen therapieresistenten und therapiesensiblen Patienten mit Interleukin-10 Spiegeln von  $88.4 \text{ pg/ml}$  bei therapieresistenten und  $12.1 \text{ pg/ml}$  bei therapiesensiblen Patienten ( $p = 0.048$ , Tabelle 6), die entsprechend dem oben Gesagtem im Verlauf erhalten blieben.

### Mögliche Einflussfaktoren auf Zytokinspiegel

Wie in Tabelle 5 dargestellt, war eine EBV-Assoziation der PTLD häufiger in der Gruppe der therapieresistenten Patienten ( $p = 0.005$ , Fisher's exact test), wohingegen sich die Frequenzen und die mittleren Höhen einer positiven EBV-DNA-Last im peripheren Blut in den beiden Gruppen nicht signifikant unterschieden.

Um einen möglichen Einfluss der EBV-Assoziation der PTLD auf die Analyse der Zytokinplasmaspiegel zu untersuchen, wurden zusätzlich die gemischten linearen Modelle ausgewertet, die als weitere feste Effekte die EBV-Assoziation der PTLD enthielten (Tabelle 7).

In diesen Modellen konnte kein signifikanter Einfluss der EBV-Assoziation auf die Zytokinplasmaspiegel gefunden werden. Als Haupteinflussfaktor für den Verlauf des

Interleukin-6-Spiegels wurde erneut das Ansprechen auf die Therapie bestätigt (p=0.001 für den Effekt der Therapieantwort, p=0.52 für einen Einfluss von EBV, p=0.647 für eine mögliche Interaktion von EBV und Therapieansprechen).

**Tabelle 7: Einfluss der EBV-Assoziation auf die Zytokin-Regressionsmodelle**

Zytokinplasmaspiegel ~ Therapieansprechen x EBV-Einfluss auf PTLD x Zeit (Feste Effekte)				
		Wert	SE	P
<b>IL-6</b>	Δ EBV-Assoziation (pg/ml)	+11.116	17.246	0.052
	Δ EBV-assozierte Therapieantwort (pg/ml)	-8.447	18.421	0.647
<b>TNFα</b>	Δ EBV-Assoziation (pg/ml)	-2.267	15.059	0.184
	Δ EBV-assozierte Therapieantwort (pg/ml)\$	+10.965	17.463	0.531
<b>IL-10</b>	Δ EBV-Assoziation (pg/ml)	+62.437	103.930	0.549
	Δ EBV-assozierte Therapieantwort (pg/ml)\$	-45.900	112.350	0.684

Eine weitere wichtige mögliche Einflussgröße auf Zytokinspiegel ist die applizierte medikamentöse Therapie. Wir bewerteten deshalb weiterhin diejenigen Modelle, die zusätzlich auch die Behandlungsmodalität als festen Effekt enthielten (Gabe von Rituximab (ja/nein), Applikation von Chemotherapie (ja/nein)).

Erneut zeigte sich allein das Ansprechen auf die Therapie, nicht jedoch die Art der applizierten Therapie als Einflussfaktor für den Verlauf der Zytokinplasmaspiegel von Interleukin-6 (p=0.0015) und TNF-alpha (p<0.001). Unverändert zu dem ursprünglichen Modell (siehe oben) wurde für die auf die Therapie ansprechenden Patienten eine durchschnittliche Abnahme des Interleukin-6-Plasmaspiegels um -0.314 mg/ml/Tag errechnet. Die Abnahme der TNF-alpha-Spiegel betrug -0.240 mg/ml/Tag. Der Verlauf der Zytokinplasmaspiegel wurde nicht durch die Applikation von Rituximab oder Chemotherapie beeinflusst (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Einfluss der gewählten Therapie auf die Zytokin-Regressionsmodelle**

Zytokinplasmaspiegel ~ Therapieansprechen x med. Therapieregime x Zeit (Feste Effekte)				
		Wert	SE	P
<b>IL-6</b>	Δ Veränderungen im Verlauf der Zeit unter Rituximab-Therapie (pg/ml/day)	-0.003	0.007	0.619
	Δ Veränderungen im Verlauf der Zeit unter Chemotherapie (pg/ml/day)	-0.001	0.007	0.909
<b>TNFα</b>	Δ Veränderungen im Verlauf der Zeit unter Rituximab-Therapie (pg/ml/day)	+0.002	0.006	0.698
	Δ Veränderungen im Verlauf der Zeit unter Chemotherapie (pg/ml/day)	+0.004	0.006	0.581
<b>IL-10</b>	Δ Veränderungen im Verlauf der Zeit unter Rituximab-Therapie (pg/ml/day)	-0.005	0.023	0.817
	Δ Veränderungen im Verlauf der Zeit unter Chemotherapie (pg/ml/day)	+0.010	0.022	0.660

### **3.6 T-Zell Subpopulationen bei Diagnosestellung**

Die Analyse der T-Zell-Populationen bei Patienten mit PTLD zeigte, verglichen mit den Kontrollpersonen, niedrigere Gesamtzahlen CD3-positiver T-Lymphozyten. Sowohl der Durchschnittswert war niedriger (872 Zellen/ $\mu$ l bei den PTLD-Patienten versus 1182 Zellen/ $\mu$ l bei den Kontrollpersonen,  $p=0.04$ ) als auch der Median. Er lag bei den PTLD-Patienten bei 830 Zellen/ $\mu$ l, bei den Kontrollpersonen bei 1045 Zellen/ $\mu$ l,  $p=0.045$ .

Bei Differenzierung in T-Helfer- und T-Suppressor-Zellen fiel ein signifikanter Unterschied in der durchschnittlichen Anzahl der CD4-positiven T-Zellen auf: 356/ $\mu$ l bei den PTLD-Patienten vs. 546/ $\mu$ l bei den Kontrollen ( $p=0.01$ ). Hingegen gab es keinen signifikanten Unterschied in der durchschnittlichen Anzahl CD8-positiven T-Zellen ( $p=0.344$ ).

Innerhalb der verschiedenen T-Zell-Subpopulationen war der deutlichste Unterschied die durchschnittlich höhere Zahl HLA-DR CD8 und CD4-positiver Zellen:

HLA-DR+CD8+: 52% bei PTLD-Patienten vs. 25% bei Kontrollen ( $p=0.003$ ).

HLA-DR+CD4+: 33% bei PTLD-Patienten vs. 16% bei Kontrollen ( $p=0.004$ ).

Außerdem fanden wir ein leicht erhöhtes Aufkommen von CD11+CD8-positiven T-Zellen (87% vs. 77%,  $p=0.007$ ). Bei B-Zellen, NK-Zellen, CD57+CD8+, CD57+CD4+, CD28+CD8+, CD28+CD4+ und CD11a+CD4+ T-Zellen zeigten sich hingegen keine signifikanten Unterschiede (alle  $p>0.05$ ).

Bei der Analyse des Zellstatus der PTLD-Patienten untereinander fiel ein signifikanter Unterschied bei der Durchschnittsmenge der HLA-DR-positiven zytotoxischen T-Zellen auf: Patienten die nicht auf die Therapie ansprachen, hatten deutlich mehr zytotoxische T-Zellen im Blut als solche, die später auf die Therapie ansprachen: 70% zytotoxische T-Zellen bei Nicht-Ansprechern gegenüber nur 44% bei Ansprechern ( $p=0.008$ ).

Die Gesamtmenge der CD3-positiven-, CD4-positiven- und CD8-positiven T-Zellen zeigte keine signifikanten Unterschiede innerhalb der PTLD-Patienten ( $p>0.05$ ).

### 3.7 Veränderungen von T-Zell-Subpopulationen im zeitlichen Verlauf

Um auszuschließen, dass die identifizierten Unterschiede der Zytokinplasmaspiegel lediglich eine Folge von Unterschieden in Gesamtlymphozytenzahlen oder Veränderungen von Lymphozytensubpopulationen darstellten, wurden die oben beschriebenen gemischten linearen Modelle auch auf die Lymphozytenpopulationen angewendet (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Gemischtes lineares Regressionsmodell für Lymphozytenpopulationen**

	Wert	Standard- abweichung	p
<b>Totale Leukozytenzahl</b>			
Ausgangswerte (/nl)	8.102	1.106	<b>&lt;0.001</b>
Δ Ausgangswert Therapieansprecher (TA) (/nl)	-0.867	1.269	0.495
Veränderung im zeitlichen Verlauf (/nl/Tag)	+0.004	0.011	0.726
Δ Veränderung im zeitlichen Verlauf bei TA (/nl/Tag)	-0.004	0.011	0.723
<b>CD3+ Zellen</b>			
Ausgangswerte (/nl)	0.935	0.150	<b>&lt;0.001</b>
Δ Ausgangswert Therapieansprecher (TA) (/nl)	-0.190	0.172	0.272
Veränderung im zeitlichen Verlauf (/nl/Tag)	-0.006	0.002	<b>0.001</b>
Δ Veränderung im zeitlichen Verlauf bei TA (/nl/Tag)	+0.006	0.002	<b>0.001</b>
<b>CD3+4+ Zellen</b>			
Ausgangswerte (/nl)	0.2882	0.059	<b>&lt;0.001</b>
Δ Ausgangswert Therapieansprecher (TA) (/nl)	+0.036	0.066	0.587
Veränderung im zeitlichen Verlauf (/nl/Tag)	-0.002	0.001	0.053
Δ Veränderung im zeitlichen Verlauf bei TA (/nl/Tag)	+0.002	0.001	<b>0.049</b>
<b>CD3+8+ Zellen</b>			
Ausgangswerte (/nl)	0.578	0.110	<b>&lt;0.001</b>
Δ Ausgangswert Therapieansprecher (TA) (/nl)	-0.198	0.127	0.121
Veränderung im zeitlichen Verlauf (/nl/Tag)	-0.004	0.001	<b>&lt;0.001</b>
Δ Veränderung im zeitlichen Verlauf bei TA (/nl/Tag)	+0.004	0.001	<b>&lt;0.001</b>
<b>HLA-DR+ Zellen in der CD8+ Zell-Untergruppe</b>			
Ausgangswerte (%)	74.088	6.599	<b>&lt;0.001</b>
Δ Ausgangswert Therapieansprecher (TA) (%)	-32.481	7.544	<b>&lt;0.001</b>
Veränderung im zeitlichen Verlauf (%)	-0.163	0.059	<b>0.007</b>
Δ Veränderung im zeitlichen Verlauf bei TA(%)	+0.161	0.059	<b>0.007</b>

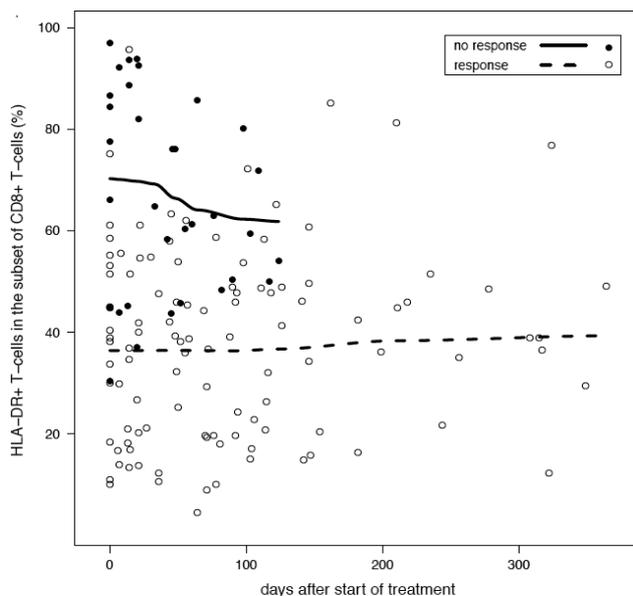
Bei den Subpopulationen folgender T-Zellen: CD19+, CD16+, CD57+, CD28+, CD11a+ CD8+/CD8-, CD4+CD8+ und CD4-CD8- wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden.

Die Lösung der entsprechenden Gleichungen zeigte keine Korrelation der Gesamtleukozytenzahlen im Verlauf mit dem Ansprechen oder Nichtansprechen auf eine Therapie, wohingegen die Zahl der T-Zellen signifikant mit der Zeit abnahm ( $p=0.001$ ), was vermutlich auf den immunsuppressiven Effekt der Chemotherapie zurückzuführen ist. Entsprechend war diese Abnahme bei den therapierefraktären Patienten stärker ausgeprägt. Gleiches galt für die Subpopulation der T-Killer-Zellen ( $p<0.001$ ).

Auch die T-Helfer-Zellen nahmen im zeitlichen Verlauf leicht ab. Diese Abnahme war jedoch nicht signifikant ( $p=0.053$ ). Im Vergleich der beiden Patientengruppen war auch hier der Rückgang bei den therapierefraktären Patienten stärker ausgeprägt ( $p=0.049$ ).

Die bereits prätherapeutisch bestehenden Unterschiede in der Frequenz HLA-DR-positiver zytotoxischen T-Zellen zwischen therapiesensiblen und therapierefraktären Patienten (70% versus 44%) zeigten sich auch im zeitlichen Verlauf in den beiden Gruppen ( $p<0.001$ , Bild 3).

**Bild 3: Verteilung von aktivierten zytotoxischen T-Zellen bei PTLD-Patienten nach Therapiestart.**



**Bild 3:** Legende wie bei Bild 2a und 2b. Prätherapeutisch sind die HLA-DR+CD8+T-Zellen bei Patienten mit PTLD signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollen (nicht dargestellt). Patienten, die nicht auf die Therapie ansprechen zeigen konstant höhere Werte als therapiesensible Patienten ( $p=0.008$ ). Dieser Unterschied blieb während der gesamten Therapie bestehen.

Eine Berücksichtigung der EBV-Assoziation in den verschiedenen Modellen erbrachte kein wegweisend anderes Ergebnis. Insbesondere zeigte die EBV-Assoziation der PTLD keinen Effekt auf die Frequenz HLA-DR-positiver T-Zell-Subpopulationen.

#### **4. Diskussion**

Wir konnten in dieser Studie zeigen, dass Patienten mit PTLD zum Zeitpunkt der Diagnose signifikant höhere Interleukin-6 und Interleukin-10-Spiegel aufweisen als transplantierte Patienten ohne PTLD. Dieses wurde bereits zuvor in anderen Studien beschrieben, u.a. von Birkeland et al. und Muti et al. (75, 49). Interleukin-10 wurde von einzelnen Arbeitsgruppen sogar bereits als Tumormarker bezeichnet (76), und Posttransplantationslymphome wurden als Quelle einer Interleukin-6-Produktion beschrieben (16).

Diese Studien haben aber lediglich Interleukinspiegel bei Patienten mit PTLD zum Zeitpunkt der Erstdiagnose mit denen von Kontrollpatienten verglichen. Beobachtungen, wie sich die erhöhten Interleukinspiegel bei Patienten mit PTLD unter einer therapeutischen Intervention verändern, wie wir dies in dieser Studie untersucht haben, fehlen. Entsprechend wurde hier zum ersten Mal eine Korrelation der Interleukin-6-Spiegel mit Tumorwachstum bzw. Tumorregression im Sinne von steigenden Interleukin-6-Spiegeln bei Tumorprogress und fallenden Spiegeln bei Ansprechen auf die applizierte Therapie nachgewiesen. Bei Diagnosestellung waren die durchschnittlichen Interleukin-6-Plasmaspiegel bei allen PTLD-Patienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen erhöht. Innerhalb der Gruppe der Patienten mit PTLD zeigten sich hingegen keine signifikanten Unterschiede. Dies ist gut mit dem Konzept einer Korrelation von Interleukin-6-Spiegeln mit der Tumormasse in Einklang zu bringen und kann durch eine Produktion von Interleukin-6 im Tumorgewebe (16) erklärt werden. Interleukin-6-Spiegel sind folglich ein nützlicher Parameter zum Verlaufsmonitoring von Patienten mit PTLD. Patienten mit posttherapeutisch weiterhin erhöhten Interleukin-6-Plasmaspiegeln sind daher suspekt für eine persistente, bisher nicht diagnostizierte Lymphommanifestation.

Auch die TNF-alpha-Spiegel waren bei Patienten mit PTLD im Vergleich zu Kontrollpersonen erhöht, ohne dass sich bei Diagnosestellung signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppe der Patienten mit PTLD zeigten. Auch in der

Verlaufsbeobachtung der TNF-alpha-Spiegel zeigte sich analog zu den Interleukin-6-Spiegeln ein signifikanter Anstieg bei Patienten, die nicht auf die applizierte Therapie ansprachen. Im Gegensatz zu den Interleukin-6-Spiegeln waren die Ausgangswerte im Vergleich zu den Kontrollpatienten aber nur gering erhöht und bei Patienten, die auf die Therapie ansprachen, zeigte sich auch kein signifikanter Abfall. Die TNF-alpha-Spiegel scheinen somit eher Ausdruck einer inflammatorischen Reaktion bei unkontrollierter Tumorerkrankung, sowie der bei diesen Patienten applizierten intensiven Chemotherapie und deren Folgen wie vermehrter infektiöser Komplikationen zu sein. Die Lymphoproliferation selbst scheint hier insgesamt eher wenig beizutragen.

Die Interleukin-10-Spiegel zeigten keinerlei signifikante Veränderungen im Krankheitsverlauf. Allerdings unterschieden sich die Ausgangsspiegel von Patienten, die auf die Therapie ansprachen von denen, die nicht ansprachen, erheblich. Erhöhte Interleukin-10-Spiegel bei Diagnosestellung waren prädiktiv und mit einem schlechten Therapieansprechen assoziiert.

Eine relevante Beeinflussung der Zytokinplasmaspiegel durch die histologische EBV-Assoziation konnten wir mit Hilfe statistischer Modelle ausschließen. Auch zeigte sich kein Unterschied der Ausgangswerte der Gesamtzahl der T-Lymphozyten, der T-Helfer-Zellen oder der T-Suppressor-Zellen bei therapiesensiblen und therapierefraktären Patienten. Da im weiteren Verlauf bei therapiesensiblen, aber auch bei therapierefraktären Patienten, ein signifikanter Abfall der Gesamt-T-Zell-Zahlen, wie auch der T-Helfer- und T-Suppressor-Zell-Zahlen festgestellt werden konnte, können Veränderungen der peripheren Lymphozytenzahlen die Veränderungen der Interleukin-6 und TNF-alpha-Plasmaspiegel ebenfalls nicht erklären. Ein relevanter Einfluss der pro- oder antiinflammatorischen Wirkung von Chemotherapie und Rituximab auf die gefundenen Ergebnisse wurde ebenfalls durch Ausweitung der statistischen Modelle, mit Hinzunahme der Art der applizierten Therapie, als zusätzliche Kovariate ausgeschlossen. Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass die EBV-Assoziation der Erkrankung, Unterschiede in der applizierten Therapie oder Veränderungen von Lymphozytensubpopulationen für die beobachteten Unterschiede im Verlauf der Zytokinplasmaspiegel bei therapiesensiblen und therapierefraktären Patienten verantwortlich sind. Als Einschränkung für eine generalisierende Aussage muss jedoch sicherlich der relativ

hohe Anteil später, monomorpher und EBV-negativer PTLD in dieser Studie genannt werden. Auch wenn dieses gut das Patientenkollektiv adulter Patienten mit PTLD in der PTLD-1 Studie widerspiegelt, können die Zusammenhänge nicht zwangsläufig auf frühe, polymorphe PTLD übertragen werden. Allerdings gibt es auch keinen Hinweis, dass hier grundsätzlich andere Verhältnisse angenommen werden müssen.

### Interleukin-6

Interleukin-6 kann nach den beobachteten Ergebnissen und der verfügbaren Literatur als ein Proliferations-assoziiertes Zytokin betrachtet werden. Da die Höhe des Plasmaspiegels weder mit der Zahl der zirkulierenden Lymphozyten noch mit dem histologischen EBV-Status korreliert, ist eine virale Produktion oder eine Sekretion aus zirkulierender Lymphozyten unwahrscheinlich, kann aber gut durch eine direkt tumor-assoziierte Sekretion erklärt werden. Jedoch ist es, wie häufig bei korrelativen Studien, schwierig zu bestimmen, was Ursache und was Folge eines beobachteten Zusammenhangs ist.

Frühere Arbeiten haben sich mit der Wirkung von Interleukin-6 auf die Tumorigenität von EBV-infizierten B-Zellen von Mäusen beschäftigt und einen positiven Zusammenhang entdeckt (77, 72). In einer Studie wurden Biopsien lymphoproliferativen Gewebes von 10 PTLD-Patienten in vitro auf eine Interleukin-6-Produktion untersucht. In 9/10 Gewebeproben konnte innerhalb eines bestimmten Zeitraums eine Interleukin-6-Produktion in vitro nachgewiesen werden. Allerdings konnte nicht differenziert werden, von welchen Zellen die Produktion stammte. Die Autoren mutmaßen, dass die EBV-infizierten B-Lymphozyten nicht der Produktionsort sind. Zum Vergleich wurde in vitro die Interleukin-6-Produktion im Blut von Monozyten von neun Patienten mit infektiöser Mononukleose untersucht. Hier fanden sich nur sehr niedrige Interleukin-6-Werte (16).

Eine weitere Studie konnte eine erfolgreiche Therapie von Patienten mit PTLD mit einem Interleukin-6-Antikörper nachweisen: Von 12 Patienten mit einer PTLD erreichten mit der Interleukin-6-Antikörpertherapie acht Patienten einen Krankheitsrückgang: 5/12 Patienten erreichten eine komplette Remission und 3/12 Patienten eine partielle Remission (39).

Eine mögliche Erklärung für die erfolgreiche Therapie mit Interleukin-6-Antikörpern liefert eine Studie, die Patienten mit AIDS-assoziierten diffus großzelligen Lymphomen untersuchte. Hierbei stellte sich heraus, dass viele Tumorzellen Interleukin-6-Rezeptoren auf der Zellmembran exprimieren, aber selbst kein Interleukin-6 produzieren. Stattdessen findet eine parakrine Stimulation des Tumors durch Interleukin-6-produzierende umgebende T-Zellen, Endothelzellen und Makrophagen statt (78). Ein anderer Mechanismus wurde von Ruff et al. beschrieben: In einer experimentellen Studie wurden Zelllinien AIDS-assoziiierter Non-Hodgkin-Lymphome bei Makaken untersucht. Diese Zellen wurden zwar durch den transforming growth factor-beta (TGF-beta) in ihrem Wachstum inhibiert. Jedoch wurde bei gleichzeitiger Stimulation von Interleukin-6 die wachstumsmindernde Wirkung von TGF-beta teilweise aufgehoben. Interleukin-6 induzierte über Aktivierung von STAT3-Proteinen proliferative und anti-apoptotische Zelleffekte (79).

Zusammengefasst deuten diese Studien auf eine wichtige Rolle von Interleukin-6 sowohl in der Entstehung als auch Aufrechterhaltung maligner Lymphome bei immunsupprimierten Patienten hin.

Eine Sekretion durch Tumor-infiltrierende T-Zellen erklärt den beobachteten Zusammenhang von klinischem Verlauf und Höhe von Interleukin-6-Spiegeln.

### Interleukin-10

Hohe Interleukin-10-Spiegel erhöhen das Risiko für eine PTLD, möglicherweise aber auch - wie unsere Daten zeigen - das Rezidivrisiko bzw. die Therapieresistenz unter oder nach therapeutischen Interventionen: Zum Diagnosezeitpunkt haben wir bei PTLD-Patienten höhere Interleukin-10-Plasmaspiegel beobachtet als bei Kontrollen. Bei therapierefraktären Patienten waren die Interleukin-10-Spiegel höher als bei therapiesensiblen Patienten. Da im Weiteren die Höhe der Interleukin-10-Spiegel aber nicht mit dem Verlauf korrelierte, sondern nur die Ausgangswerte prädiktiv waren, kann vermutet werden, dass hohe Interleukin-10-Spiegel eher die autonome B-Zell-Proliferation begünstigen als die Proliferation direkt aufrecht zu erhalten.

Interleukin-10 nimmt neben weiteren Zytokinen (Interleukin-2, Interleukin-6, TNF-alpha, Interleukin-1 und Lymphotoxin alpha) eine Schlüsselrolle bei der Lymphozytenreifung ein, insbesondere bei der Weichenstellung des pro- oder

antiinflammatorischen Weges im Sinne einer vorherrschenden Th1- oder Th2-Antwort (80). Die Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichts ist wichtig für die Unterdrückung autonomer Lymphoproliferationen (81). In diesem Zusammenhang ist zu bedenken, dass Interleukin-10 auch eine enge Verwandtschaft zu dem EBV-kodierten Genprodukt BCRF1 aufweist, welches dem humanen Interleukin-10 strukturell zu fast 85% gleicht und die Funktion von humanem Interleukin-10 vollständig imitieren kann (82-85). Dies legt nahe, dass viele der von Interleukin-10 ausgelösten Reaktionen dem Virus nutzen, wie zum Beispiel die autokrine Wachstumsfunktion von Interleukin-10 an B-Zellen (17, 82) und die Fähigkeit, die Produktion anti-viraler Zytokine, zum Beispiel Interferon-gamma, zu hemmen (49, 82, 84) sowie B-Zellen selbst zu einer erhöhten Interleukin-10-Sekretion anzuregen (17).

Babel et al. untersuchten genetische Polymorphismen an verschiedenen Zytokin-Genloci. Von Interleukin-10 wurde eine Punktmutation an der Position -1082 untersucht. Der Interleukin-10 -1082 Genpolymorphismus besteht aus drei Phänotypen: GG (high producer), GA (middle/low producer), AA (low producer) (86). Der -1082 Interleukin-10-GG Polymorphismus, der für den sogenannten „high producer“, also eine verstärkte Interleukin-10-Produktion, kodiert, wurde signifikant häufiger bei den gesunden Kontrollpatienten als bei den PTLD-Patienten gefunden (87).

Dieses Ergebnis ist zunächst nicht ganz einfach in Einklang zu bringen mit unseren und den von anderen Gruppen beobachteten Ergebnissen, dass erhöhte Interleukin-10-Spiegel die Entstehung von PTLD (49, 88) oder anderen EVB-assoziierten Tumoren, wie dem Burkitt-Lymphom, fördert (89).

Vermutlich ist es die EBV-Assoziation, die die Beobachtungen erklärt. In unserer Patientenpopulation gab es 21 EBV-negative und 17 EBV-positive Patienten. Bei nur 52% war der Interleukin-10-Spiegel zum Zeitpunkt der Diagnose erhöht. Wir haben nicht evaluiert, inwieweit diese Erhöhung EBV-assoziiert war, aber es ist vorstellbar, dass die EBV-Infektion die Interleukin-10-Spiegel in noch größere Höhen trieb, als es die Punktmutation im Interleukin-10-Gen bei den gesunden Kontrollpatienten der oben genannten Studie tat (87). Denn abgesehen von einer PTLD und möglicherweise stark erhöhten Interleukin-10-Werten durch EBV, ist eine hohe Produktion von

Interleukin-10 nach Herz- und Lebertransplantation mit einem längeren Überleben assoziiert (90-92).

### TNF-alpha

Der Tumornekrose-Faktor alpha (TNF-alpha) hat nach unseren Untersuchungen keinen spezifischen Einfluss auf den Verlauf einer PTLD.

Der Spiegel steigt bei den Nicht-Ansprechern, allerdings waren die prätherapeutischen TNF-alpha-Spiegel bei den PTLD-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen nicht wesentlich erhöht. Der Anstieg kann daher am ehesten als Resultat einer inflammatorischen Aktivität im Rahmen eines unkontrollierten malignen Geschehens gedeutet werden.

### T-Zell-Subpopulationen

Die absoluten CD3+ und CD4+ Lymphozytenzahlen waren bei den PTLD-Patienten signifikant niedriger als bei den Kontrollen. Ausdrücklich sei darauf hingewiesen, dass die Kontrollpatienten so ausgesucht waren, dass diese eine ähnliche iatrogene Immunsuppression aufwiesen wie die PTLD-Patienten - vergleichbar in Substanzgruppen und Dosierungen. Trotzdem waren die Gesamt-T-Zell-Zahlen sowie die Zahl der T-Helferzellen signifikant niedriger, die applizierte Immunsuppression offensichtlich somit funktionell stärker und die Patienten folglich „überimmunsupprimiert“. Dies steht in Einklang mit früheren Veröffentlichungen: Sebelin-Wulf et al. beobachteten ebenfalls signifikant niedrigere CD4+ Lymphozytenzahlen bei Patienten mit PTLD (93). EBV-spezifische T-Helfer-Zellen erkennen das Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA1) und das vom Virus exprimierte Latent Membrane Protein 1 (LMP1) (94, 95). Außerdem konnte gezeigt werden, dass CD4+ Zellen für die Aufrechterhaltung der Funktion von CD8+ Gedächtniszellen benötigt werden (96-98). EBV-spezifischen T-Helfer-Lymphozyten können so zur Vermeidung EBV-assoziiertes Tumore beitragen (93,99). Diese Erkenntnisse bekräftigen das Prinzip der Reduktion der Immunsuppression in der Behandlung einer PTLD, um so zu versuchen, den Tumor zunächst allein durch die Rekonstitution der T-Zell-Kontrolle zu eliminieren.

Die Expression von HLA-DR kennzeichnet eine aktivierte Population zytotoxischer T-Zellen (100). In unserer Studie war der Anteil der HLA-DR-positiven CD8-positiven

Lymphozyten zwischen therapiesensiblen und therapierefraktären Patienten signifikant unterschiedlich: Während der Anteil HLA-DR-positiver CD8-positiver Zellen bei Kontrollpatienten ohne PTLD bei 33% lag, lag dieser bei Patienten mit therapiesensibler PTLD bei 44% und bei Patienten mit therapierefraktärer PTLD bei 70%. Gegen die Hypothese, dass es sich bei diesen Zellen um EBV-spezifische zytotoxische T-Zellen handelt, spricht die Verteilung bei EBV-assoziiertes und nicht EBV-assoziiertes PTLD: So betrug der Anteil von HLA-DR-positiven CD8-positiven Zellen therapierefraktärer Patienten mit EBV-negativer PTLD sogar 80%, hingegen aber 40% bei therapiesensiblen Patienten mit EBV-Assoziation. Eine naheliegendere, alternative Interpretation ist die, dass es sich um eine polyklonale Expansion zytotoxischer T-Zellen aufgrund höherer pro-inflammatorischer Zytokinlevel bei Nicht-Ansprechern handeln könnte. Dies widerspricht aber der Beobachtung, dass die pro-inflammatorische Zytokine Interleukin-6 und TNF-alpha bei den auf die Therapie ansprechenden und den nicht auf die Therapie ansprechenden Patienten bei der Diagnosestellung nicht signifikant unterschiedlich waren. Eine mögliche Erklärung liefern zwei Studien, die die CD8-positive T-Zell-Population bei Knochenmarkstransplantierten Patienten mit PTLD untersuchten. Hier wurde gezeigt, dass die Reduktion der Immunsuppression mit einem Anstieg der CD8-Zellzahlen assoziiert war sowie mit einer Expansion oligoklonaler zytotoxischer T-Zell-Populationen und dass die Expansion dieser Zellpopulationen zu einem Rückgang der Erkrankungsmanifestationen führte (101, 102). Die Schlussfolgerung ist, dass CD8-positiv T-Zellen verantwortlich sind für die Kontrolle maligner Zellproliferationen (101). Des Weiteren wird von einem Patienten mit EBV-positiver PTLD berichtet, der eine HLA-kompatible, allogene, EBV-spezifische T-Zell-Therapie erhielt. Innerhalb einer Woche kam es hier zu einer Tumorregression und zur Elimination der EBV-Viruslast im peripheren Blut. Bereits wenige Stunden nach Applikation der T-Zell-Therapie konnten T-Zell-Vorläuferzellen im Blut des Patienten nachgewiesen werden, sowie ein Anstieg von HLA-DR-positiven CD8-positiven T-Zellen und eine Umkehr der CD4/CD8-Ratio. Der Patient erreichte letztlich durch diese Therapie eine komplette Remission für 24 Monate (40). Entsprechend könnte die erhöhte Frequenz der HLA-DR-positiven CD8-positiven T-Zellen bei Patienten mit PTLD einen anhaltenden, jedoch frustrierten Versuch des Immunsystems zur Elimination des malignen Klon darstellen. Die Tatsache, dass bereits prätherapeutisch bei therapierefraktären Patienten die Frequenzen dieser Zellpopulation höher sind als bei therapiesensiblen

Patienten, kann als Negativselektion auf hoch aggressive, stark antigene B-Zell-Proliferationen interpretiert werden, die dann zu einem großen Teil auch nicht auf subsequente Rituximab- und/oder Chemotherapie ansprechen.

## **5. Zusammenfassung**

Interleukin-10 wurde 1989 als ein pleiotrop wirkendes Zytokin entdeckt und hat sowohl immunsupprimierende als auch immunstimulierende Eigenschaften. Die immunsupprimierende Wirkung wird vornehmlich durch eine Hemmung der Zytokin-Produktion von Th1-Zellen vermittelt, wodurch die Antigen-spezifische Aktivierung und Proliferation von T-Zellen herabgesetzt wird. Auf der Ebene der B-Zellen wirkt Interleukin-10 proliferationsfördernd und fördert die Differenzierung von B-Zellen in Immunglobulin-sezernierende Zellen (immunstimulierender Effekt). Interleukin-6 gehört zu den wichtigsten proinflammatorischen Zytokinen und fördert die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen in zytotoxische Zellen. Bei EBV-assoziierten B-Zell-Proliferationen werden Interleukin-6 ferner transformations- und proliferationsfördernde Effekte und eine Wirkung als autokriner Wachstumsfaktor zugeschrieben. Die Datenlage zu beiden Zytokinen bei PTLD ist insgesamt aber begrenzt und beschränkt sich auf kleinere funktionelle Studien (Interleukin-6) sowie hauptsächlich Vergleiche von Zytokineplasmaspiegeln bei Patienten mit PTLD und Kontrollen (Interleukin-6 und Interleukin-10). Longitudinale Studien fehlen.

Um weiteren Einblick in die Funktion dieser Zytokine bei PTLD zu gewinnen und ihren Nutzen als prognostische und/oder prädiktive Marker zu evaluieren, analysierten wir in einer longitudinalen Studie mit 38 PTLD-Patienten die Plasmaspiegel von Interleukin-6, Interleukin-10 und TNF-alpha sowie Lymphozytensubpopulationen. Unsere Analyse zeigte prätherapeutisch signifikant erhöhte Interleukin-6- (13.8 pg/ml) und Interleukin-10-Plasmaspiegel (54.7 pg/ml) bei Patienten mit PTLD und erstmals auch bedeutende Unterschiede im Verlauf. So waren bereits prätherapeutisch die Interleukin-10-Spiegel bei therapierefraktären Patienten deutlich höher als bei therapiesensiblen Patienten, wohingegen die prätherapeutischen Interleukin-6-Spiegel nicht signifikant unterschiedlich waren. Allerdings zeigte sich im therapeutischen Verlauf eine signifikante Korrelation der Interleukin-6-Spiegel mit dem Therapieergebnis im Sinn zunehmender Interleukin-6-Spiegel bei Erkrankungsprogress und abnehmender Spiegel bei Ansprechen auf die Therapie. Die Veränderungen der Interleukin-6-Plasmaspiegel waren dabei unabhängig von der EBV-Assoziation der Erkrankung, dem gewählten Therapieregime und den Gesamt-T-Zell-Zahlen, die bei allen Patienten mit PTLD signifikant erniedrigt war.

Unsere Ergebnisse legen daher nahe, dass hohe Interleukin-10-Spiegel ein günstiges Milieu für die Entstehung und Persistenz einer PTLD schaffen, wohingegen Interleukin-6 mit der proliferativen Aktivität der PTLD korreliert. Klinisch sind hohe Interleukin-10-Spiegel ein prognostisch und prädiktiv ungünstiger Marker. Interleukin-6-Spiegel eignen sich indes für die Verlaufskontrolle der PTLD.

Neben einer deutlichen Reduktion der absoluten T-Zellzahlen bei Patienten mit PTLD, zeigten unsere Untersuchung zu Lymphozyten-Subpopulationen einen markanten Unterschied in der Frequenz HLA-DR-positiver T-Zellen bei Kontroll-Patienten ohne PTLD (33%), therapiesensiblen Patienten mit PTLD (44%) und therapierefraktären Patienten (70%). Auch wenn die Spezifität dieser Zellen unklar ist, liegt die Vermutung nahe, dass sie Ausdruck einer funktionell beeinträchtigten tumorspezifischen T-Zell-Antwort sind.

## **6. Literaturverzeichnis**

- 1.) Webseite der Deutschen Stiftung Organtransplantation, Unterseite Pressebilder und Grafiken; Webseite abgerufen am 14. Mai 2012
- 2.) Penn I, Hammond W, Brettschneider L, Starzl TE. Malignant lymphomas in transplantation patients. *Transplant Proc.* 1969; 1: 106–112
- 3.) Oertel SH, Verschuuren E, Reinke P et al. Effect of Anti-Cd 20 Antibody Rituximab in Patients with Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder (Ptld). *Am J Transplant* 2005; 5: 2901-6
- 4.) Choquet S, Leblond V, Herbrecht R et al. Efficacy and Safety of Rituximab in B-Cell Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders: Results of a Prospective Multicentre Phase II Study. *Blood* 2006; 107: 3053-7
- 5.) Trappe R, Oertel S, Leblond V et al.: Sequential treatment with rituximab followed by CHOP chemotherapy in adult B-cell post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD): the prospective international multicentre phase 2 PTLD-1 trial, *The Lancet Oncology* 2012; 13: 196-206
- 6.) Armitage JM, Kormos RL, Stuart RS et al. Posttransplant lymphoproliferative disease in thoracic organ transplant patients: ten years of cyclosporine-based immunosuppression. *J Heart Lung Transplant.* 1991; 10(6): 877-86
- 7.) Bakker NA, van Imhoff GW, Verschuuren RA et al. Early onset posttransplant lymphoproliferative disease is associated with allograft localization. *Clin Transplant* 2005; 3: 327-34
- 8.) Trappe R, Choquet S, Oertel S, Leblond V, Riess H. Posttransplant lymphoproliferative disorders. In: Knudsen KH, eds. *Liver Transplantation: Rejection, Therapy and Post-Operative Complications*, 1st ed. Hauppauge: Nova Science Publishers Inc, 2009: 103-135
- 9.) Oertel S, Riess H. HIV-assozierte Lymphome und poststransplantationslymphoproliferative Erkrankungen. In: Hiddemann W, Dreyling M, Stein H, eds. *Lymphome*, 1st ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2004: 175-186
- 10.) Swinnen LJ., Fisher RI. OKT3 monoclonal antibodies induce IL-6 and Interleukin-10: a possible cause of lymphoproliferative disorders associated with transplantation; *Nephrology and Hypertension* 1993; 2: 670-678

- 11.) Birkeland SA, Andersen HK, Hamilton-Dutoit SJ. Preventing acute rejection, Epstein-Barr virus infection, and PTLD after kidney transplantation: use of aciclovir and mycophenolate mofetil in a steroid-free immunosuppressive protocol. *Transplantation* 1999; 67: 1209-1214
- 12.) Fleisher G, Henle W, Henle G, Lennette ET, Biggar RJ. Primary Infection with Epstein-Barr Virus in Infants in the United States: Clinical and Serologic Observations. *J Infect Dis* 1979; 139: 553-558
- 13.) Babcock GJ, Decker LL, Freeman RB, Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr Virus–Infected Resting Memory B Cells, Not Proliferating Lymphoblasts, Accumulate in the Peripheral Blood of Immunosuppressed Patients. *J Exp Med.* 1999; 16; 190: 567- 76
- 14.) Liebowitz D: Epstein-Barr virus and a cellular signaling pathway in lymphomas from immunosuppressed patients. *N Engl J Med* 1998; 20: 1413-21
- 15.) Tosato G, Seamon KB, Goldman ND et al. Monocyte-derived human B-cell growth factor identified as interferon-beta 2 (BSF-2, IL-6). *Science* 1988; 239: 502-504
- 16.) Tosato G, Jones K, Breinig MK, McWilliams HP, McKnight JL. Interleukin-6 production in posttransplant lymphoproliferative disease. *J Clin Invest* 1993; 91: 2806-14
- 17.) Burdin N, Péronne C, Banchereau J, Rousset F. Epstein-Barr virus transformation induces B lymphocytes to produce human interleukin 10. *J Exp Med.* 1993; 177: 295-304
- 18.) Gosslein J, Menezes J, Mercier G, Lamoureux G, Oth D. Differential Interleukin-2 and Interferon-gamma production by human lymphocyte cultures exceptionally resistant to Epstein Barr Virus immortalization. *Cell Immunol* 1989, 122: 440-449
- 19.) Hasler F, Bluestein HG, Zvaifler NJ, Epstein LB. Analysis of the defect responsible for the Impaired Regulation of Epstein-Barr Virus-induced B Cell Proliferation by Rheumatoid Arthritis Lymphocytes: I: Diminishes Gamma Interferon Production in Response to Autologous Stimulation. *J Exp Med* 1983, 157: 173-188
- 20.) Lotz M, Tsoukas CS, Fong S, Carson DA, Vaughan JH. Regulation of Epstein-Barr Virus Infection by Recombinant Interferons: Selected Sensitivity to Interferon-gamma. *Eur J Immunol* 1985, 15: 520-525
- 21.) Dotti G, Fiocchi R, Motta T et al. Epstein-Barr virus-negative lymphoproliferative disorders in long-term survivors after heart, kidney, and liver transplant. *Transplantation* 2000; 69:827-33

- 22.) Nelson BP, Nalesnik MA, Bahler DW, Locker J, Fung JJ, Swerdlow SH. Epstein-Barr virus-negative post-transplant lymphoproliferative disorders: a distinct entity? *Am J Surg Pathol* 2000; 24:375-85
- 23.) Gao SZ, Chaparro SV, Perlroth M 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: 505-514
- 24.) Swinnen LJ, Costanzo-Nordin MR, Fischer SG et al. Increased Incidence of Lymphoproliferative Disorder After Immunosuppression With the Monoclonal Antibody OKT3 in Cardiac-transplant Recipients. *N Engl J Med* 1990, 323: 1723-1728
- 25.) Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. *Annals of Oncology* 2002;13:490-1
- 26.) Zimmermann H, Reinke P, Neuhaus R et al. Burkitt post-transplantation lymphoma in adult solid organ transplant recipients: Sequential immunochemotherapy with rituximab (R) followed by cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) or R-CHOP is safe and effective in an analysis of 8 patients. *Cancer* 2012; 118: 4715-24
- 27.) Cesarman E, Chadburn A, Liu YF, Migliazza A, Dalla-Favera R, Knowles DM. BCL-6 gene mutations in posttransplantation lymphoproliferative disorders predict response to therapy and clinical outcome. *Blood* 1998; 92: 2294-302
- 28.) Knowles DM, Cesarman E, Chadburn A et al. Correlative morphologic and molecular genetic analysis demonstrates three distinct categories of posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Blood* 1995; 85: 552-65
- 29.) Zimmermann H, Trappe R. Therapeutic options in posttransplant lymphoproliferative disorders. *Therapeutic Advances in Hematology* 2011; 2: 393-407
- 30.) Parker A, Bowles K, Bradley JA et al. Management of post-transplant lymphoproliferative disorder in adult solid organ transplant recipients - BCSH and BTS Guidelines. *Br J Haematol.* 2010 ; 149: 693-705
- 31.) Reshef R, Luskin MR, Kamoun M et al. Association of HLA polymorphisms with post-transplant lymphoproliferative disorder in solid-organ transplant recipients. *Am J Transplant.* 2011; 11: 817-25

- 32.) Swinnen LJ. Diagnosis and treatment of transplant-related lymphoma. *Ann Oncol* 2000; 11 Suppl 1: 45-8
- 33.) Swinnen LJ, LeBlanc M, Grogan TM et al. Prospective study of sequential reduction in immunosuppression, interferon alpha-2B, and chemotherapy for posttransplantation lymphoproliferative disorder. *Transplantation*. 2008; 86: 215-22
- 34.) González-Barca E, Domingo-Domenech E, Capote FJ et al. Prospective phase II trial of extended treatment with rituximab in patients with B-cell post-transplant lymphoproliferative disease. *Haematologica* 2007; 92: 1489-94
- 35.) Choquet S, Oertel S, LeBlond V et al. Rituximab in the management of post-transplantation lymphoproliferative disorder after solid organ transplantation: proceed with caution. *Ann Hematol*. 2007; 86: 599-607
- 36.) Montserrat E. PTLTD treatment: a step forward, a long way to go. *The Lancet Oncology* 2012; 13: 120-121
- 37.) Allen U, Hebert D, Moore D, Dror Y, Wasfy S. Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disease in solid organ transplant recipients, 1988-97: a Canadian multicentre experience. *Pediatr Transplant* 2001; 5: 198-203
- 38.) Tsai DE, Hardy CL, Tomaszewski JE et al. Reduction in immunosuppression as initial therapy for posttransplant lymphoproliferative disorder: analysis of prognostic variables and long-term follow-up of 42 adult patients. *Transplantation* 2001; 71: 1076-88
- 39.) Haddad E, Paczesny S, Leblond V et al. Treatment of B-lymphoproliferative disorder with a monoclonal anti-interleukin-6 antibody in 12 patients: a multicenter phase 1-2 clinical trial. *Blood* 2001; 97: 1590-7
- 40.) Haque T, Taylor C, Wilkie GM et al. Complete regression of posttransplant lymphoproliferative disease using partially HLA-matched Epstein Barr virus-specific cytotoxic T cells. *Transplantation* 2001; 72: 1399-402
- 41.) Webseite des Kompetenznetzes maligne Lymphome, Unterseite Studien und Studiengruppen, Studienprotokolle der DPTLD SG, <http://www.lymphome.de/Gruppen/DPTLD SG/Protokolle/index.jsp>, Webseite abgerufen am 16.05.2012
- 42.) Shah PC, Brolin RE, Amenta PS, Deshmukh DR. Effect of aging on ischemia and reperfusion injury. *Mech Ageing Decelop*. 1999; 107: 37-50

- 43.) Hancock WW, Wang L, Ye Q, Han R, Lee I. Chemokines and their receptors as markers of allograft rejection and targets for immunosuppression. *Curr Opin Immunol.* 2004; 15: 479-86
- 44.) El Sawy T, Fahmy NM, Fairchild RL. Chemokines: directing leukocyte infiltration into allografts. *Curr Opin Immunol.* 2002; 14: 562-8
- 45.) Hancock WW, Lu B, Gao W et al. Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. *J Exp Med.* 2000; 192: 515-20
- 46.) Fischereder M, Luckow B, Hocher B et al. CC chemokine receptor 5 and renal transplant survival. *Lancet.* 2001; 357: 1758-61
- 47.) Fischereder M, Kretzler M. New immunosuppressive strategies in renal transplant recipients. *J Nephrol.* 2004; 17: 9-18
- 48.) Moore KW, O'Garra A, Malefyt RDW, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 165-190
- 49.) Muti G, Mancini V, Ravelli E, Morra E. Significance of Epstein-Barr virus (EBV) load and interleukin-10 in post-transplant lymphoproliferative disorders. *Leuk Lymphoma* 2005; 46: 1397-407
- 50.) Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T-Helper Cell: IV: Th2 Clones Secrete a Faktor that inhibites cytokine production by TH1 clones. *J. Exp. Med,* 1989; 170: 2081-95
- 51.) Vieira P, de Waal-Malefyt R, Dang MN et al. Isolation and Expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones : Homology to Epstein-Barr Virus open reading frame BCRF1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88: 1172-1176
- 52.) Howard M, O'Garra A, Ishida H, de Waal Malefyt R, de Vries J. Biological properties of Interleukin 10. *J Clin Immunol* 1992, 12: 239- 247
- 53.) de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991, 174: 915-924
- 54.) Ding L, Shevach EM. Interleukin-10 inhibits mitogen-induced T Cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J immunol* 1992; 148: 3133-3139
- 55.) Bendtzen K. Cytokines and natural regulators of cytokines. *Immunol Lett* 1994; 43: 111-123

- 56.)Mahot S, Sergeant A, Drouet E. A novel function for the Epstein–Barr virus transcription factor EB1/Zta: induction of transcription of the hInterleukin-10 gene, *Journal of General Virology* 2003; 84: 965–974
- 57.)Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O`Garra A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor, *Annu. Rev. Immunol.* 2001; 19: 683-765
- 58.)Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA, Mosmann TR. Homology of Cytokine Synthesis inhibitory factor (Interleukin-10) to the Epstein-Barr Virus Gene BCRF1, *Science* 1990; 248: 1230-1234
- 59.)Hsu DH, de Waal Malefyt R, Fiorentino DF et al. Expression of Interleukin-10 activity by Epstein-Barr Virus Protein BCRF1. *Science* 1990; 250: 830-832
- 60.)Scala G, Quinto I, Ruocco MR, Mallardo M, Squitieri B, Venuta S: Introduction of Tumorigenicity and Plasmacytoid Differentiation in EBV-B cells by Expression of Exogenous IN-6 or IN-6 Receptor Genes. *Leukemia* 1992; Suppl 3: 26S-29S
- 61.)Ikebuchi K, Wong GG, Clark SC, Ihle JN, Hirai Y, Ogawa M. Interleukin-6 enhancement of interleukin-3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc. Natl. A cad. Sci. USA* 1987; 84: 9035-39
- 62.)Wong GG., Witek-Giannotti J, Temple P et al. Stimulation of murine hemopoietic colony formation by human IL-6. *J. Immunol.* 1988; 140: 3040-44
- 63.)Takai Y, Wong G, Clark S, Burakoff S, Herrmann S. B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 1988; 140: 508-12
- 64.)Hirano T, Taga T, Nakano N et al. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc. Natl. A cad. Sci. USA* 1985; 85: 5490-94
- 65.)Muraguchi A., Hirano T, Tang B et al. The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J. Exp. Med.* 1988; 67: 332-44
- 66.)Van Snick, J. Interleukin-6: an overview. *Annu. Rev. Immunol.* 1990; 8: 253-278.
- 67.)Kawano M, Hirano T, Matsuda T et al. Autocrine Generation and Requirement of BSF-2/IL-6 for Human Multiple Myelomas. *Nature* 1988; 332: 83-85
- 68.)Zhang XG, Klein B, Bataille R: Interleukin-6 is a Potent Myeloma-cell Growth Factor in Patients with Aggressive Multiple Myeloma. *Blood* 1989; 74: 11-13
- 69.)Zhang XG, Bataille R, Widjenes J, Klein B. Interleukin-6 dependence of Advanced Malignant Plasma Cell Dyscrasias. *Cancer* 1992; 69 : 1373-1376

- 70.)Kishimoto T. The Biology of Interleukin-6. *Blood* 1989; 74: 1-10
- 71.)Yokoi T, Miyawaki T, Yachie A, Kato K, Kashara Y, Taniguchi N: Epstein-Barr-Virus-immortalized B Cells Produce IL-6 as an Autocrine Growth Factor. *Immunology* 1990; 70: 100-105
- 72.)Tanner J., Tosato G. Impairment of natural killer functions by interleukin-6 increases lymphoblastoid cell tumorigenicity in athymic mice. *J. Clin. Invest.* 1991; 88: 239-247
- 73.)Swinnen LJ, Costanzo-Nordin MR, Fisher SG et al. Increased of Lymphoproliferative Disorder after Immunosuppression with the monoclonal Anibody OKT3 in cardiac-transplat redipients. *N Engl J Med* 1990; 323: 1723-1728
- 74.)Evens AM, David KA, Helenowski I et al. Multicenter analysis of 80 solid organ transplantation recipients with post-transplantation lymphoproliferative disease: outcomes and prognostic factors in the modern era. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1038-46
- 75.)Birkeland SA, Bendtzen K, Moller B, Hamilton-Dutoit S, Andersen HK. Interleukin-10 and posttransplant lymphoproliferative disorder after kidney transplantation. *Transplantation* 1999; 67: 876-81
- 76.)Muti G, Klersy C, Baldanti F et al. Epstein–Barr virus (EBV) load and Interleukin-10 in EBV-positive and EBV-negative post-transplant lymphoproliferative disorders. *Br J Haematol* 2003; 122: 927-33
- 77.)Scala G, Quinto I, Ruocco MR et al. Expression of exogenous interleukin-6 gene in human Epstein-Barr virus B cells confers growth advantage and in vivo tumorigenicity. *J. Exp. Med.* 1990; 172: 61-68
- 78.)Fassone L, Gaidano G, Ariatti C et al. The role of cytokines in the pathogenesis and management of AIDS-related lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2000; 38: 481-8
- 79.)Ruff KR, Puetter A, Levy LS. Growth regulation of simian and human AIDS-related non-Hodgkin’s lymphoma cell lines by TGF-beta1 and IL-6. *BMC Cancer* 2007; 7: 35
- 80.)Rothman N, Skibola CF, Wang SS et al. Genetic variation in TNF and IL10 and risk of non-Hodgkin lymphoma: a report from the InterLymph Consortium. *Lancet Oncol* 2006; 7: 27-38
- 81.)Yun AJ, Lee PY. The link between T helper balance and lymphoproliferative disease. *Med Hypotheses* 2005; 65: 587-90

- 82.)Bejarano MT, Masucci MG. Interleukin-10 abrogates the inhibition of Epstein-Barr virus-induced B-cell transformation by memory T-cell responses. *Blood* 1998; 92: 4256-62
- 83.)Fickenscher H, Hor S, Kupers H, Knappe A, Wittmann S, Sticht H. The Interleukin-10 family of cytokines. *Trends in Immunology* 2002; 23: 89–96
- 84.)Ryon JJ, Hayward SD, MacMahon EM et al. In situ detection of lytic Epstein-Barr virus infection:expression of the Not1 early gene and viral Interleukin-10 late gene in clinical specimens. *The Journal of Infectious Diseases* 1993; 168: 345–351
- 85.)Hayes DP, Brink AATP, Vervoort MBHJ, Middeldorp JM, Meijer CJLM, van den Brule AJC. Expression of Epstein-Barr virus (EBV) transcripts encoding homologues to important human proteins in diverse EBV associated diseases. *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology* 1999; 52: 97–103
- 86.)Kohlhase, B. Untersuchung von Interleukin-10, Tumornekrosefaktor-alpha und Interleukin-6 Genpolymorphismen und deren Auswirkungen auf den Langzeitverlauf von Nierentransplantaten, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2009
- 87.)Babel N, Vergopoulos A, Trappe RU et al. Evidence for genetic susceptibility towards development of posttransplant lymphoproliferative disorder in solid organ recipients. *Transplantation* 2007; 84: 387-91
- 88.)Garnier JL, Blanc Brunat N, Vivier G, Rousset F, Touraine JL. Interleukin-10 in Epstein-Barr virus-associated post-transplant lymphomas. *Clinical Transplantation* 1999; 13: 305–312
- 89.)Benjamin D, Knobloch TJ, Dayton MA. Human B-cell Interleukin-10: B-cell lines derived from patients with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of Interleukin-10. *Blood*. 1992; 80: 1289-98
- 90.)Plaza DM, Fernandez D, Builes M, Villegas A, Garcia LF. Cytokine gene polymorphisms in heart transplantation: association of low Interleukin-10 production genotype with Quilty effect. *J Heart Lung Transplant*. 2003; 22: 851-856
- 91.)Turner D, Grant SC, Yonan N et al. Cytokine gene polymorphism and heart transplant rejection. *Transplantation*. 1997; 64: 776- 779.

- 92.) Warle MC, Farhan A, Metselaar HJ et al. In vitro cytokine production of TNF $\alpha$  and IL-13 correlates with acute liver transplant rejection. *Hum Immuno*. 2001; 62: 1258-1265
- 93.) Sebelin-Wulf K, Nguyen TD, Oertel S et al. Quantitative analysis of EBV-specific CD4/CD8 T cell numbers, absolute CD4/CD8 T cell numbers and EBV load in solid organ transplant recipients with PLTD. *Transpl Immunol* 2007; 17: 203-10
- 94.) Leen A, Meij P, Redchenko I et al. Differential immunogenicity of Epstein–Barr virus latent-cycle proteins for human CD4(+) T-helper 1 responses. *J Virol* 2001; 75: 8649–59
- 95.) Paludan C, Munz C. CD4+T cell responses in the immune control against latent infection by Epstein–Barr virus. *Curr Mol Med* 2003; 3: 341–7
- 96.) Sun JC, Williams MA, Bevan MJ. CD4+T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+T cells after acute infection. *Nat Immunol* 2004; 5: 927–33
- 97.) Rosenberg ES, Altfeld M, Poon SH et al. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature* 2000; 407: 523–6
- 98.) Altfeld M, Rosenberg ES. The role of CD4(+) T helper cells in the cytotoxic T lymphocyte response to HIV-1. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 375–80
- 99.) Piriou E, van Dort K, Nanlohy NM et al. Loss of EBNA1-specific memory CD4+and CD8+T cells in HIV-infected patients progressing to AIDS-related non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2005; 106: 3166–74
- 100.) Ko HS, Fu SM, Winchester RJ, Yu DT, Kunkel H.G. Ia determinants on stimulated human T lymphocytes: occurrence on mitogen- and antigen-activated cells. *J. Exp. Med.* 1979; 150: 246-55
- 101.) Khatri VP, Baiocchi RA, Peng R et al. Endogenous CD8+ T cell expansion during regression of monoclonal EBV-associated posttransplant lymphoproliferative disorder. *J Immunol* 1999; 163: 500-6
- 102.) Kuzushima K, Kimura H, Hoshino Y et al. Longitudinal dynamics of Epstein–Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes during posttransplant lymphoproliferative disorder. *J Infect Dis* 2000; 182: 937-40

## Erklärung der Selbständigkeit

Ich, Sylke Wendland, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

*Interleukin-6-, Interleukin-10- und TNF-alpha-Plasmaspiegel bei Patienten mit transplantations-assoziiierter lymphoproliferativer Erkrankung*

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.

---

Ort, Datum

---

Sylke Wendland

## **Lebenslauf**

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