

Aus dem Deutschen Herzzentrum Berlin
Klinik für Angeborene Herzfehler und Kinderkardiologie

DISSERTATION

**Spezifische T-Zell-Immunität gegen Epstein-Barr-
Virusantigene in Patienten nach Herztransplantation im
Kindesalter**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Simon Johannes Hingler
aus Münster

Datum der Promotion: 26.02.2016

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	5
<i>Abstract</i>	6
1. Einleitung.....	8
1.1. Herztransplantation im Kindesalter	8
1.1.1. Indikation.....	8
1.1.2. Prognose und häufigste Todesursachen	8
1.2. <i>Post-transplant Lymphoproliferative Disorder</i> (PTLD)	9
1.2.1. Risikofaktoren für das Auftreten einer PTLD	10
1.2.2. WHO-Klassifikation der PTLD	11
1.2.3. Symptome.....	12
1.2.4. Diagnosestellung	12
1.2.5. Therapie.....	13
1.2.5. Prognose.....	13
1.3. Epstein-Barr Virus (EBV).....	14
1.3.1. Aufbau und Einteilung	14
1.3.2. Primärinfektion und Immunantwort	14
1.3.4. Latente Infektion mit EBV.....	15
1.3.5. EBV-Reaktivierung: Lytische Infektion	15
1.3.6. EBV und Tumorentstehung.....	16
1.4. <i>Enzyme-linked Immunospot Assay</i> (EliSpot).....	17
1.4.1. Vergleich mit anderen Methoden	17
1.4.2. Der EliSpot zur Abschätzung des Risikos für PTLD.....	18
1.5. Ziel der vorliegenden Arbeit.....	19
2. Methoden	20
2.1. Studienpopulation	20
2.2. Patientenaufklärung und Ethikvotum.....	20
2.3. Blutentnahme	20
2.4. Durchführung des EliSpot-Assays.....	21
2.4.1. Versuchsprinzip.....	21
2.4.2. Versuchsprotokoll.....	22
2.4.3. Materialien	24
2.5. Bestimmung der Epstein-Barr-Viruslast mittels quantitativer rtPCR	25
2.6. Aufbereitung der Messergebnisse und statistische Auswertung.....	25
3. Ergebnisse	27
3.1. Studienpopulation	27
3.1.1. Basisdaten	28
3.1.2. Immunsuppression.....	28
3.1.3. PTLD.....	28
3.1.4. EBV-Status vor Transplantation	28
3.2. Epstein-Barr-Viruslast	30
3.3. EBV-EliSpot.....	32
3.4. Subgruppenanalyse	33
3.4.1. Vergleich zwischen Patienten mit hoher bzw. niedriger Viruslast.....	33
3.4.2. Einflussfaktor PTLD	35
3.4.3. Einfluss der immunsuppressiven Therapie auf den EliSpot	37

3.4. Serielle Messungen.....	38
3.4.1. Patienten ohne PTLD in der Anamnese	38
3.4.2. Patienten mit PTLD in der Anamnese	40
3.5. Auswertung nicht erfolgreicher Messversuche	42
3.5.1. Zu geringe Ausbeute der Zellseparation	42
4. Diskussion	44
4.1. Studienpopulation	44
4.2. Ergebnisse der EliSpot-Untersuchung	44
4.2.1. Zusammenhang zwischen EBV-Viruslast und EBV-spezifischen CD8+ T-Lymphozyten.....	45
4.2.2. Einflussfaktor PTLD	46
4.2.3. Einflussfaktor Immunsuppression	47
4.2.4. Serielle Messungen bei Patienten mit und ohne PTLD in der Anamnese.....	48
4.3. Technische Umsetzbarkeit von EliSpot-Untersuchungen bei Kindern	48
4.3.1. Notwendige Lymphozytenzahl zur Durchführung des EliSpot.....	49
4.3.2. Notwendige Menge Blut für den EliSpot.....	49
4.3.3. Effektivität der Ficoll-Separation.....	49
4.4. Limitationen.....	50
4.4.1. Studiendesign	50
4.4.2. Methode	50
5. Zusammenfassung.....	52
6. Literaturverzeichnis	53
Eidesstattliche Versicherung	59
Lebenslauf.....	60
Danksagungen	62

Abkürzungsverzeichnis

µg	-	Mikrogramm
µl	-	Mikroliter
ATG	-	Anti-Thymozyten-Globulin
BamHI	-	Proteinbezeichnung
BART	-	BamHI A rightward transcripts
BCIP	-	5-Brom-4-chlor-3-indolyphosphat
Bcl-6	-	engl.: <i>B-cell Lymphoma 6 Protein</i>
BMLF	-	Proteinbezeichnung
BRLF	-	Proteinbezeichnung
BZLF	-	Ausführliche Bezeichnung: <i>Trans-activator Protein BZLF-1</i>
CD	-	engl.: <i>Cluster of Differentiation</i>
CHOP	-	Cyclophosphamid, Adriamycin, Vincristin und Prednisolon
c-myc	-	Genbezeichnung
Cr	-	Chrom
CT	-	Computertomographie
Ct	-	engl.: <i>Cycle threshold</i>
CyA	-	Cyclosporin A
d	-	Tage
DHZB	-	Deutsches Herzzentrum Berlin
DLBCL	-	engl.: <i>Diffuse Large B Cell Lymphoma</i>
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
EBER	-	engl.: <i>Epstein-Barr virus encoded small RNA</i>
EBNA	-	engl.: <i>Epstein-Barr nuclear antigen</i>
EBV	-	Epstein-Barr Virus
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure
EliSpot	-	engl.: <i>Enzyme-linked Immunospot Assay</i>
Eve	-	Everolimus
FACS	-	engl.: <i>Flow-activated Cell Sorter</i>
FAM	-	6-Carboxyfluorescein
HHV	-	Humanes Herpesvirus
HIV	-	Humanes Immundefizienzvirus
HL	-	Hodgkin Lymphom
HLA	-	Humanes Leukozyten Antigen

HTx	-	Herztransplantation
IM	-	Infektiöse Mononukleose
INF	-	Interferon
ISHLT	-	engl.: International Society for Heart and Lung Transplantation
J	-	Jahre
LCL	-	Lymphoblastoide Zell-Linie
LMP	-	engl.: <i>Latent Membrane Protein</i>
MHC	-	Major-Histokompatibilitätskomplex
ml	-	Milliliter
MMF	-	Mycophenolat Mofetil
MRT	-	Magnetresonanztomographie
NK	-	„Natürliche Killer“-Zellen
OKT3	-	Eigenname: Orthoclone OKT3 (Muronomab CD-3)
p53	-	Genbezeichnung
PBMC	-	engl.: <i>Peripheral Blood Monocytical Cells</i>
PBS	-	engl.: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	-	Polymerasekettenreaktion
PET-CT	-	Positronen-Emissions-Tomographie
PTLD	-	engl.: <i>Post Transplant Lymphoproliferative Disorder</i>
RNA	-	Ribonukleinsäure
RPMI	-	Roswell Park Memorial Institute
rt	-	engl.: <i>real time</i>
SFU	-	engl.: <i>Spot Forming Units</i>
TAMRA	-	Tetramethylrhodamin
TaqMan	-	Thermus aquaticus DNA Polymerase
TNF	-	Tumornekrosefaktor
Tx	-	Transplantation
WHO	-	engl.: <i>World Health Organization</i>
ZEBRA	-	Proteinbezeichnung

Zusammenfassung

Lymphoproliferative Erkrankungen (PTLD für engl.: *Post-transplant lymphoproliferative Disorder*) stellen eine schwerwiegende Komplikation der immunsuppressiven Therapie nach Organ- oder Stammzelltransplantation dar. Bei Patienten nach pädiatrischer Herztransplantation beträgt die Häufigkeit 9% nach 10 Jahren und 17% nach 15 Jahren, die 5-Jahres-Überlebensraten werden mit 50-70% angegeben. Bei Kindern sind >80% der Fälle Epstein-Barr-Virus (EBV)-assoziiert. Es wird angenommen, dass die durch Immunsuppressiva eingeschränkte T-Zell-Immunität gegen virusinfizierte und Tumorzellen die maligne Transformation von latent EBV-infizierten B-Zellen begünstigt. Als Risikofaktoren wurden definiert: Eine intensive Immunsuppression, eine EBV-Primärinfektion unter Immunsuppression bzw. ein EBV-*Mismatch* (Spender positiv/Empfänger negativ) und eine chronisch erhöhte EBV-Viruslast nach Transplantation.

Wir untersuchten 34 Patienten nach Herztransplantation im Kindesalter hinsichtlich ihrer Epstein-Barr-Viruslast und ihrer EBV-spezifischen CD8+ T-Zellantwort im Interferon-Gamma-EliSpot. Darüber hinaus wurde die aktuelle EBV-Viruslast mittels *real-time* PCR ermittelt und klinische und paraklinische Daten aus den Akten der Patienten erhoben.

9/34 Patienten (26,5%) hatten eine PTLD in der Anamnese. Es zeigte sich eine stärkere Immunantwort auf lytische Antigene bei Patienten mit hoher Viruslast (Grenzwert 2000 Kopien/ml: $p=0,06$; Grenzwert 16000 Kopien/ml: $p=0,16$). Wurden nur Patienten ohne PTLD in der Anamnese analysiert, zeigte sich eine signifikant stärkere Immunantwort auf lytische Antigene bei Patienten mit hoher Viruslast (Grenzwert 16000 Kopien/ml: $p=0,03$). Patienten mit PTLD in der Anamnese hatten signifikant höhere Viruslasten ($p=0,001$) jedoch fehlte eine signifikant stärkere Immunantwort auf lytische Antigene. Wurden nur Patienten mit Viruslast > 16000 Kopien/ml betrachtet, zeigten Patienten mit Z.n. PTLD eine schwächere Immunantwort auf lytische Antigene ($p=0,18$). In seriellen Messungen sahen wir bei 6/9 Patienten ein deutliches Ansteigen der lytischen Immunantwort im Falle eines Ansteigens der Viruslast. Bei einem Patienten mit PTLD in der Anamnese war dieser Zusammenhang umgekehrt.

Die Vorliegenden Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass bei Patienten mit PTLD in der Anamnese eine gestörte EBV-spezifische T-Zell-Immunität vorliegen könnte. Hieraus ergibt sich die Fragestellung, ob mittels EliSpot eine Vorhersage über

das individuelle Risiko, eine EBV-assoziierte PTLD zu entwickeln, möglich ist. Weitere, idealerweise multizentrisch angelegte Studien sind notwendig, um dies zu untersuchen.

Abstract

Post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD) is a severe complication of immunosuppressive therapy following solid-organ or stem cell transplantation. In patients after pediatric heart transplantation the prevalence is 9% after 10 years and 17% after 15 years. The 5-year survival rates range from 50-70%. In children >80% of the cases are associated with Epstein-Barr-Virus (EBV). EBV is known to latently infect B-Lymphocytes, promote growth and affect apoptosis. It is being hypothesized that in the face of impaired T-cell control of viral infection and tumor growth due to immunosuppression, the malignant transformation of these B-cells is facilitated. Accordingly, the following risk-factors for PTLD have been described: An intensive immunosuppression, a primary EBV-infection under immunosuppressive medication or EBV-mismatch (donor positive/recipient negative), and chronically elevated EBV viral loads after transplantation.

We screened 34 patients who had received a pediatric heart transplantation for their EBV viral load via real-time PCR and their EBV-specific CD8+ T-cell response using the Interferon- γ EliSpot. Additionally, clinical data and laboratory results were obtained from the patients' files.

9/34 patients (26,5%) had a history of PTLD. We observed a stronger immune response to stimulation with lytic antigens in patients with high viral load (cutoff 2000 copies/ml: $p=0,06$; cutoff 16000 copies/ml: $p=0,16$). When analyzing only patients without history of PTLD there was a significantly stronger response to lytic antigens in patients with high viral load (cutoff 16000 copies/ml: $p=0,03$). Patients with a history of PTLD showed higher viral loads ($p=0,001$) while lacking a stronger immune response to lytic antigens. When analyzing only patients with viral loads greater than 16000 copies/ml, patients with a history of PTLD had a weaker response to lytic antigens ($p=0,18$). In serial measurements we saw a marked increase in the response to lytic antigens in case of increasing viral loads in 6/9 patients. In one patient with a history of PTLD this relation was inverted.

The data presented here leads to the hypothesis, that patients with a history of PTLD have an impaired EBV-specific T-cell-immunity. Further, preferably multicentric studies are needed to elucidate, whether such findings in the EliSpot assay allow the early identification of patients at greater risk of PTLD.

1. Einleitung

1.1. Herztransplantation im Kindesalter

Die orthotope Herztransplantation ist 47 Jahre nach der ersten durchgeführten Operation im Jahre 1967 eine etablierte Therapie bei terminaler Herzinsuffizienz im Kindesalter [1]. Das Register der *International Society for Heart and Lung Transplantation* (ISHLT) erfasst jährlich zwischen 500 und 600 Herztransplantationen bei Kindern weltweit [2].

1.1.1. Indikation

Im ersten Lebensjahr ist die häufigste Indikation zur Herztransplantation ein angeborener Herzfehler (54%, Tendenz fallend), gefolgt von Kardiomyopathien (41%, Tendenz steigend). Im Kindes- und Jugendalter ist die Verteilung umgekehrt mit ca. 60% Kardiomyopathien und 30% angeborener Herzfehler [1, 3].

1.1.2. Prognose und häufigste Todesursachen

Das mittlere Überleben der Patienten nach Operation konnte in den vergangenen Jahren deutlich gesteigert werden. Es liegt aktuell bei 19,7 Jahren im Median für im ersten Lebensjahr bis 12,4 Jahre für im Jugendalter Transplantierte. Dies ist vor allem bedingt durch eine Senkung der Früh-Mortalität nach Transplantation. Im ersten Jahr nach der Transplantation sind die häufigsten Todesursachen Transplantatversagen und Multi-Organversagen, gefolgt von Infektionen und akuten Abstoßungsreaktionen. Transplantatversagen bleibt bis über 10 Jahre nach Operation die häufigste Todesursache. Mit zunehmender Dauer nimmt die Häufigkeit von akuten Abstoßungen ab, während das Risiko einer Transplantatvaskulopathie zunimmt. In den Zeiträumen 5 bis 10 Jahre und >10 Jahre nach Transplantation liegen Lymphome (auch *Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder/Disease*, *PTLD* genannt, s.u.) mit 6-7% an vierter Stelle der häufigsten Todesursachen [3] (siehe Tabelle 1).

Tab. 1: Häufigkeit unterschiedlicher Todesursachen in Prozent aller nach Herztransplantation im Kindesalter verstorbenen, geordnet nach Zeiträumen posttransplantationem. Ausgewertet wurden 1786 Todesfälle nach Herztransplantation aus dem Register der International Society for Heart and Lung Transplantation. (nach Dipchand et. al. [3])

Todesursache	0 – 30 d	31 d – 1 J	> 1 – 3 J	> 3 – 5J	> 5 – 10 J	> 10 J
Transplantatvaskulopathie	1,0	4,4	16,0	24,2	23,7	26,3
Akute Abstoßung	8,3	15,6	19,5	13,0	12,9	5,0
Lymphom	-	1,6	2,3	3,3	6,9	6,3
Andere Tumore	-	1,3	1,5	0,9	2,1	4,1
Transplantatversagen	35,5	18,4	34,0	35,3	34,0	30,6
Multiorganversagen	13,1	18,4	4,6	4,2	2,6	5,3
Infektionen	12,1	15,0	6,5	3,7	4,2	7,2
Andere	29,9	25,3	15,7	15,4	13,5	15,3

Alle Angaben in %. „Andere“ enthält Technische Fehler, Nierenversagen, Pulmonale Komplikationen, zerebrovaskuläre Ereignisse und weitere, nicht näher bezeichnete Todesursachen. d = Tage, J = Jahre

1.2. *Post-transplant Lymphoproliferative Disorder (PTLD)*

Der Begriff *post-transplant lymphoproliferative disorder* (PTLD) bezeichnet ein weites Spektrum lymphatischer Proliferationen, welche nach Organ- oder Stammzelltransplantation auftreten [4]. Das größte Risiko tragen pädiatrische Patienten nach Transplantation von Herz, Lungen, nach kombinierten Herz-Lungentransplantationen und Darmtransplantationen (6-20%) [5, 6]. Die *International Society for Heart and Lung Transplantation* (ISHLT) gibt in ihrem aktuellen jährlichen Bericht die Häufigkeit für im Kindesalter Herztransplantierte mit 9% in den ersten 10 Jahren und 17% in den ersten 15 Jahren posttransplantationem an [2]. Die Krankheit hat eine hohe Mortalität, die 2- (bzw. 5-) Jahresüberlebensraten werden mit 50-70% angegeben [6, 7]. Besonders bei Kindern kann in über 80% der Fälle Epstein-Barr-Virus (EBV) in den Lymphomzellen nachgewiesen werden [8]. Da bekannt ist, dass EBV Einfluss auf Apoptose und Zelldifferenzierung nimmt, wird angenommen, dass die latente Infektion von B-Lymphozyten durch Epstein-Barr-Virus das Risiko einer malignen Transformation dieser Zellpopulation erhöht. Dies wird begünstigt durch die durch Immunsuppressiva

eingeschränkte T-Zell-Immunität gegen sowohl virusinfizierte als auch maligne transformierte Zellen [9]. Die PTLD stellt somit einen entscheidenden Faktor für Morbidität und Mortalität im Verlauf nach pädiatrischer Herztransplantation dar.

1.2.1. Risikofaktoren für das Auftreten einer PTLD

Die bestdokumentierten Risikofaktoren für die Entstehung einer PTLD sind eine hohe Intensität der Immunsuppression, EBV-Seronegativität zum Zeitpunkt der Transplantation, EBV-*Mismatch* (Empfänger negativ/Spender positiv), EBV-Reaktivierung im Verlauf, sowie das Alter des Empfängers von unter 10 oder über 60 Jahren [4, 7, 10].

Der Einfluss einzelner immunsuppressiver Substanzen auf das Risiko einer PTLD wird kontrovers diskutiert. So konnte zum Einen gezeigt werden, dass der Gebrauch von Azathioprin (dauerhafte immunsuppressive Therapie) und Anti-Thymozyten-Globulin (ATG, Induktionstherapie peri- oder unmittelbar posttransplantationem) mit einem erhöhten Risiko für PTLD assoziiert war [10, 11]. Auch für den CD3-Antikörper Muronomab (OKT3), der zur Induktionstherapie verwandt wird, und Tacrolimus (Erhaltungstherapie) ist ein erhöhtes Risiko beschrieben [14, 15]. Andere Studien zeigten keinen relevanten Einfluss der Induktion auf die Inzidenz der PTLD [12, 13]. Für Mycophenolat-Mofetil [16] und Sirolimus/Everolimus wird ein möglicher protektiver Effekt hinsichtlich PTLD diskutiert [17]. Die Fachgesellschaft ISHLT sieht nach Auswertung der ihr vorliegenden Registerdaten keinen Zusammenhang zwischen Art der Induktionstherapie oder immunsuppressiven Erhaltungstherapie und dem Auftreten von Lymphomen [2].

In den vergangenen Jahren rückten auch genetische Einflussfaktoren in den Fokus der Forschung. So konnte gezeigt werden, dass ein *Mismatch* im Bereich verschiedener Humaner Leukozyten Antigen (HLA) Loci und das reine Vorhandensein einiger HLA-Haplotypen bei Empfänger oder Spender Einfluss auf das Risiko einer PTLD haben. Dabei war das Risiko vergrößert bei folgenden Konstellationen: Mismatch bei HLA-A26 und B38, sowie Vorhandensein von HLA-A2, -A11, -B5, -B18, -B21 oder -B35 beim Empfänger. Das Risiko war geringer bei Vorhandensein von HLA-A03 oder -DR7 beim Empfänger bzw. HLA-A1, -B8, oder -DR3 beim Spender [18, 19].

1.2.2. WHO-Klassifikation der PTLD

Die Weltgesundheitsorganisation (im Weiteren WHO für *World Health Organization*) unterscheidet nach histomorphologischen, zytoimmunologischen und molekulargenetischen Kriterien 4 Formen von PTLD (Siehe Tabelle 2).

Tab. 2: WHO-Klassifikation der PTLD (2008), nach Jagadeesh, et al. [4].

Kategorie	Charakteristika
„ <i>Early lesions</i> “ Plasmatische Hyperplasie IM-ähnliche Läsionen	Monoklonalität nicht typisch; typischerweise EBV +
Polymorphe PTLD	Architektur aufgehoben, volles Spektrum lymphatischer Reifegrade präsent; oft EBV +
Monomorphe PTLD B-Zell-Neoplasien DLBCL Burkitt-Lymphom Plasmazell-Myelom Plasmozytomähn. Läsion Andere T-Zell-Neoplasien T-Zell-/NK-Zell-Neoplasien Hepatosplenisches Lymphom Andere	Architektur aufgehoben, praktisch stets monoklonalen Ursprungs; Häufigste Erscheinungsform im Kindesalter, EBV +/-
PTLD vom klassischem Hodgkin- Lymphom-Typ	Erfüllt alle Kriterien des klassischen HL, Monoklonalität nicht typisch
IM = Infektiöse Mononukleose.; DLBCL = engl. „ <i>Diffuse large B-cell lymphoma</i> “, Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom; NK = Natürlicher Killerzellen; HL = Hodgkin-Lymphom	

In die erste Gruppe der sogenannten „*early lesions*“ fallen benigne plasmatische Hyperplasien und infektiöse-mononukleose-ähnliche Erkrankungen. Die zweite Gruppe enthält polymorphe PTLD, welche polyklonalen oder häufiger monoklonalen Ursprungs sein können. In der dritten Gruppe der monomorphen PTLD finden sich aggressive, ausschließlich monoklonale B-Zell- oder T-/NK-Zell-Proliferationen. Dies ist die

häufigste Form der PTLD im Kindesalter und ist im Falle der B-Zell-Tumore typischerweise EBV-assoziiert. An vierter Stelle wird die dem klassischen Hodgkin-Lymphom ähnelnde PTLD genannt [4, 6].

1.2.3. Symptome

Die klinische Erscheinung einer PTLD variiert stark und reicht von lokalisierter Lymphadenopathie bis hin zu schwer beeinträchtigender systemischer Erkrankung [20]. Am häufigsten zeigen die Patienten zunächst eine Lymphadenopathie, bevorzugt im Kopf-/Halsbereich (oft begleitet von einer Tonsillenhypertrophie oder vorhandenen Adenoiden), zusätzlich Allgemeinsymptome mit Fieber, seltener auch Anorexie und Gewichtsverlust und/oder Abgeschlagenheit. Eine Organmanifestation findet sich im Gastrointestinaltrakt (22-39%), in Lunge und Atemwegen (25%) und im Zentralnervensystem (4-20%). In solchen Fällen kann die Klinik Durchfall und Obstipation bzw. Atemwegsobstruktion und neurologische Symptome umfassen [20, 4].

1.2.4. Diagnosestellung

Zur Überwachung der Virusaktivität erfolgen heute bei allen Patienten nach Herztransplantation regelmäßige Kontrollen der EBV-Viruslast mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) aus Vollblut. Obwohl Einzelwerte eine große Varianz aufweisen können, ist dies zum jetzigen Zeitpunkt der wichtigste Parameter zur Früherkennung einer PTLD. Da chronisch erhöhte EBV-Viruslasten oder ein plötzlicher deutlicher Anstieg ein Hinweis auf das Vorliegen einer PTLD sein können, kommen in diesen Fällen neben der eingehenden klinischen Untersuchung auch bildgebende Verfahren wie Sonographie des Abdomens, Thoraxröntgen und CT/MRT zum Einsatz. Mittels PET-CT können Lymphomherde identifiziert werden, die sich dem Nachweis durch oben genannte Untersuchung zum Beispiel aufgrund geringer Größe entziehen [21]. Die Diagnosesicherung erfolgt schließlich durch histologische Untersuchung eines exzidierten Lymphknotens. Zum Nachweis von EBV im Tumorgewebe erfolgt eine In-situ-Hybridisierung mit einer Sonde für EBV-Gene (z.B. EBER-1) [20]. Mittels Durchflusszytometrie wird in der Regel auf das Vorliegen von CD20-Antigenen auf den Tumorzellen untersucht, da dies therapeutische Konsequenzen in Form einer spezifischen Antikörpertherapie gegen CD20-positive Zellen haben kann (s.u.) [21].

1.2.5. Therapie

Die initiale Therapie für alle Formen der PTLD ist die Reduktion der immunsuppressiven Medikation, mit dem Ziel der Wiederherstellung einer ausreichenden T-Zell-Immunität gegen proliferierende bzw. Tumorzellen [22]. In 40-86% der Fälle kann alleine hierdurch eine dauerhafte Remission der Tumorerkrankung erzielt werden [4, 20, 22]. Im Falle CD20-positiver Lymphomzellen kommt zudem Rituximab, ein monoklonaler Antikörper gegen CD20-Oberflächenmarker, zum Einsatz. Darüber hinaus werden auch Chemotherapeutika, üblicherweise gemäß dem CHOP-Regime (Cyclophosphamid, Adriamycin, Vincristin und Prednisolon), verwendet. Oft werden die einzelnen Therapiestrategien kombiniert oder werden Kombinationen bei aggressiveren Subtypen der PTLD als Initialtherapie eingesetzt. Als Therapieoptionen der zweiten Wahl gelten eine antivirale Therapie mit Aciclovir oder Ganciclovir, chirurgische Tumorentfernung, Radiatio oder Immunglobulingaben [4]. Ein neuerer Therapieansatz ist die Gabe allogener EBV-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten nach vorheriger In-vitro-Stimulation [23].

1.2.5. Prognose

Unter optimaler Therapie werden die 5-Jahres-Überlebensraten nach Diagnosestellung der PTLD mit 50-70% angegeben. Todesfälle durch Tumorprogression und solche aufgrund von Transplantatabstoßung (durch Reduktion der Immunsuppression) kommen etwa gleich häufig vor [4, 7, 8]. Eine frühe Diagnose und Therapie können die Prognose entscheidend verbessern [24]. Dies unterstreicht den Wert des regelmäßigen Screenings und den Bedarf, Patienten mit einem erhöhten Risiko für PTLD früh zu identifizieren.

1.3. Epstein-Barr Virus (EBV)

Das Epstein-Barr-Virus (auch: HHV4 für Humanes Herpesvirus 4) gehört zur Familie der Herpesviridae und gehört gemeinsam mit dem HHV8 (Auslöser des Kaposi-Sarkoms) zur Unterfamilie der Gammaherpesvirinae [25]. Es wurde erstmals 1964 von Sir Michael Anthony Epstein und seinen Mitarbeitern Barr und Achong aus Tumorzellen isoliert. Die Zellen stammten von B-Zell-Lymphomen, die vom irischen Chirurgen und Tropenmediziner Denis Burkitt seit 1958 im subsaharischen Afrika erforscht wurden und heute als Burkitt-Lymphom bekannt sind [26, 27].

1.3.1. Aufbau und Einteilung

Das Virus zeigt den für Herpesviren typischen Aufbau aus linearer doppelsträngiger DNA, ikosaedrischem Kapsid und umgebender Virushülle. Das Genom besteht aus 17400 Basenpaaren, welche für ca. 100 Virusproteine kodieren. Aufgrund geringer genomischer Unterschiede werden zwei Typen von EBV unterschieden und je nach Autor als EBV A und B oder 1 und 2 bezeichnet. Mit Ausnahme einiger Regionen Afrikas und Neu-Guineas ist jedoch allseits Typ A bzw. Typ 1 vorherrschend. Die Durchseuchung der erwachsenen Weltbevölkerung mit EBV wird mit >95% angegeben [25].

1.3.2. Primärinfektion und Immunantwort

Die Infektion mit EBV erfolgt meist über die Schleimhäute des Mund- und Rachenraumes. Dort werden zunächst Epithelzellen und von diesen ausgehend gewebeständige B-Lymphozyten infiziert. Die Primärinfektion verläuft in den ersten Lebensjahren in der Regel asymptomatisch oder in Form eines banalen fieberhaften Infektes. Findet sie jedoch in der Adoleszenz oder noch später statt, ist häufiger das klinische Bild der infektiösen Mononukleose (IM) zu beobachten, auch „Pfeiffersches Drüsenfieber“ genannt. Hierbei leiden die Patienten unter Fieber, Pharyngotonsillitis mit flächenhaften, gräulichen Belägen, generalisierter Lymphadenopathie, Exanthem und Hepatosplenomegalie. Die Krankheit heilt in der Regel binnen 3-6 Wochen folgenlos aus, subfebrile Temperaturen und Abgeschlagenheit können aber noch über Monate persistieren. Die Symptome der Primärinfektion werden der massiven zytotoxischen CD8+ T-Zellantwort gegen EBV-tragende B-Lymphozyten in den unterschiedlichen Organen zugeschrieben. Während einer Erstinfektion sind bis zu 30% der zirkulierenden CD8+ T-Zellen spezifisch gegen EBV gerichtet. Während die Rolle ebenfalls nachweisbarer Anti-EBV-Antikörper und CD4+ T-Helferzellen weiterhin nicht

abschließend geklärt ist, gelten CD8+ T-Lymphozyten als die Hauptakteure in der Immunkontrolle der akuten und chronischen EBV-Infektion [28, 29, 30].

1.3.4. Latente Infektion mit EBV

Das Virus veranlasst nach der Infektion der B-Zellen zunächst deren Reifung und Proliferation und schließlich die Differenzierung zur ruhenden Memory-B-Zelle. In diesem Zustand werden innerhalb der Zelle keine Virionen produziert, und die Expression von EBV-Genprodukten ist maximal reduziert. Eines dieser auf der Virus-DNA kodierten Proteine, das EBNA 1, verhindert die Synthese von Major Histokompatibilitätskomplexen der Klasse 1 (MHC 1) und damit die Identifizierung der infizierten Zellen durch zytotoxische CD8+ T-Lymphozyten. Auf diese Weise entgeht das Epstein-Barr Virus in der latenten Phase der Immunkontrolle des Wirts [31].

Es werden 4 Arten (0-III) der Latenz des EBV unterschieden, welche sich jeweils durch die ihnen nachweisbaren Gen-Expressionsmuster unterscheiden. In der sogenannten **Latenz 0** werden lediglich nicht polyadenylierte RNA (EBER 1 und 2), das latente Membranprotein LMP2a sowie das Epstein-Barr-Virus nukleäre Antigen (EBNA) 1 gebildet. Dies ist das Expressionsmuster der latent infizierten Memory-B-Zellen in einem immunkompetenten EBV-seropositiven Individuum. Die Expressionsmuster **Latenz I** bzw. **Latenz II** wurden in vivo in Zellen des Burkitt-Lymphoms respektive in solchen des Nasopharynx-Karzinoms und Hodgkin-Lymphoms nachgewiesen. Das Proteinmuster **Latenz III** bestehend aus 6 nukleären Proteinen (EBNA 1, 2, 3a/b/c und – LP), 3 Membranproteinen (LMP1 und LMP 2a/b) den RNA-Molekülen EBER 1 und 2, sowie weiteren Transkripten der so genannten BamHIA-Region (BART) kommt bei der infektiösen Mononukleose und der PTLD in vivo sowie bei lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) auch in vitro vor.

1.3.5. EBV-Reaktivierung: Lytische Infektion

Periodisch kommt es auch im gesunden Organismus zur Reaktivierung einer latenten EBV-Infektion und erneutem Durchleben einer so genannten lytischen Phase. Hierbei lysieren (= zerfallen) infizierte Zellen und Virionen werden so an den Blutstrom oder den Speichel einer Person abgegeben. Die regulatorischen Proteine mit Namen BZLF1 und BRLF1 spielen eine Schlüsselrolle beim Übergang von latenter zu lytischer Infektion. In der lytischen Phase werden aber insgesamt über 80 verschiedene Proteine synthetisiert, darunter Aktivatoren der Virus-DNA-Synthese. Auf diese Weise aktivierte

B-Lymphozyten migrieren unter anderem in die lympho-epithelialen Gewebe des Oropharynx. Durch Lyse der infizierten Zellen werden Viruspartikel frei und sind im Speichel bzw. im Rachenabstrich nachweisbar. Wahrscheinlich werden in diesem Zusammenhang auch erneut epitheliale Zellen infiziert, in denen die Replikationsrate des Virus höher ist. Durch erneute Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch schließt sich so der Infektionszyklus des EBV mit der Infektion eines weiteren Organismus' [25].

Zusammenfassend handelt es sich bei der latenten und lytischen Phase einer EBV-Infektion um zwei abwechselnd Vorliegende Zustände, in denen jeweils charakteristische Muster von Genexpression bzw. Proteinsynthese vorherrschen. In der latenten Phase ist die Syntheseaktivität stark reduziert, das Virus „versteckt“ sich vor dem Immunsystem. In der lytischen Phase findet die Virusreplikation und -freisetzung statt, um weitere Zellen und schließlich einen neuen Wirt zu infizieren.

1.3.6. EBV und Tumorentstehung

Aufgrund seiner Erstbeschreibung in Tumorzellen und der starken Assoziation von Burkitt-Lymphomen und dem Nachweis von Viruspartikeln oder -proteinen galt das Epstein-Barr-Virus früh als das erste Tumore hervorrufende Virus. Es wird bis heute kontrovers diskutiert, ob diese Tumore tatsächlich durch EBV ausgelöst werden oder ob es sich lediglich um eine begleitende Infektion der Zellen handelt [32]. Da EBV in vitro die Fähigkeit besitzt, Lymphozyten zu immortalisieren (Lymphoblastoide Zelllinien, im weiteren LCL), schien schnell der Mechanismus der Tumorentstehung entschlüsselt. Heute weiß man, dass die Tumorzellen nicht immortalisiert sind und eher Lymphozyten des Keimzentrums oder Memory-B-Zellen ähneln als LCL [32, 33]. Es konnten jedoch mittlerweile eine Vielzahl verschiedener EBV-kodierter Proteine und darüber hinaus regulatorische mikro-RNAs identifiziert werden, die Einfluss auf Zellwachstum und Apoptose nehmen. Ein kausaler Zusammenhang zwischen EBV-Infektion und Tumorentstehung scheint demnach weiter plausibel.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass von den einzelnen Virusproteinen verschiedene Varianten existieren, die von Individuen mit unterschiedlichen HLA-Typen unterschiedlich gut erkannt werden. Diese Menschen könnten eine schlechtere Immunkontrolle hinsichtlich Epstein-Barr-Virus aufweisen, und so auch EBV enthaltende Tumorzellen schlechter erkennen und bekämpfen. Hier könnte eine Erklärung liegen, warum manche immunsupprimierte Patienten mit EBV-Reaktivierung eine Tumorerkrankung entwickeln, andere jedoch nicht [34]. Ebenfalls diskutiert wird

eine sog. „second hit“-Theorie, wonach zusätzlich zu einer latenten EBV-Infektion bestimmte molekulargenetische Veränderungen (z.B. Veränderungen in den Onkogenen c-myc, bcl-6 oder p53) vorliegen müssen, damit es zur Entwicklung einer PTLD kommt [35].

1.4. Enzyme-linked Immunospot Assay (EliSpot)

Der *Enzyme-linked Immunospot Assay* - kurz: EliSpot - ist ein Verfahren zur Quantifizierung antigenspezifischer Effektorzellen (B- oder T-Lymphozyten) nach Stimulation. Ursprünglich wurde der Test 1983 von Sedgwick und Holt zur Detektion antikörperproduzierende Zellen in einer Leukozytenpopulation entwickelt. Heutzutage wird der EliSpot jedoch vor allem eingesetzt, um antigenspezifische T-Zellen nachzuweisen. Vereinfacht dargestellt werden hierzu von einem Spender Blutzellen der monozytischen Zellreihe (PBMC für engl.: *peripheral blood monocyctical cells*) mit dem gewünschten Antigen stimuliert, woraufhin die für dieses Antigen spezifischen T-Lymphozyten Effektorstoffe sezernieren, unter anderem TNF α , Granzym B oder Interferon Gamma (INF- γ). Diese Substanzen werden zunächst auf einer Oberfläche fixiert, in einem zweiten Schritt angefärbt und die dabei entstehenden Flecken (engl.: *Spots*) gezählt. Jeder Spot entspricht dann einer stimulierbaren antigenspezifischen Effektorzelle. Der EliSpot findet heute weite Anwendung, unter anderem bei der Entwicklung von Impfstoffen, in der Transplantationsmedizin sowie in der HIV-Forschung [36].

1.4.1. Vergleich mit anderen Methoden

Es existieren verschiedene weitere Methoden, um die Aktivität von CD-8+ T-Lymphozyten zu untersuchen. Bis heute gilt der 1968 entwickelte ⁵¹Cr-Release-Assay als der Goldstandard, um die zytotoxische Aktivität zu erfassen. Hierbei wird radioaktives Chrom-51 von Zielzellen zunächst passiv aufgenommen und nach Lyse durch zytotoxische T-Zellen im Überstand einer Zellkultur messbar. Nachteile sind eine geringe Sensitivität und der Umstand, dass dieser Test keine Aussage über die Anzahl reaktiver Zellen erlaubt, da nicht die Aktivität einer einzelnen Zelle sichtbar gemacht wird.

Eine weitere etablierte Methode, die zur Quantifizierung antigenspezifischer T-Lymphozyten eingesetzt wird, ist die Durchflusszytometrie (FACS für engl.: *Fluorescence activated Cell Sorter*) nach intrazellulärem Färben oder nach Markierung

von Oberflächenantigenen mittels Antikörpern. Dabei werden Zellen einzeln an einem Laser und einem Detektor vorbeigeleitet und aus der Streuung des einfallenden Lichtstrahls Rückschlüsse auf die Beschaffenheit und Größe einer Zelle gezogen. Ein Vorteil dieser Methode liegt in der großen Menge an Daten, die durch die Anwendung verschiedener Antikörper zur gleichen Zeit über eine Zellpopulation gesammelt werden können [37]. In den vergangenen Jahren wurden neuere Verfahren vorgestellt, bei denen neben den Effektorzellen auch Zielzellen angefärbt werden und damit auch Aussagen über die tatsächlichen Zytotoxizität einer antigenspezifischen Zelle erlauben [38 Kim]. Nachteil ist auch hier eine im Vergleich zum EliSpot geringere Sensitivität, die in der Literatur mit 1 von 5×10^3 Zellen (Nachweisgrenze des EliSpot etwa 1 von 3×10^5 Zellen) angegeben wird [39].

Der EliSpot ist demnach ein hochempfindliches Verfahren, antigenspezifische und aktivierbare T-Lymphozyten auf Einzelzellniveau darzustellen. Eine Limitation dieser Methode ist, dass sie keine Aussage über die zytotoxische Aktivität einer stimulierbaren Zelle erlaubt.

1.4.2. Der EliSpot zur Abschätzung des Risikos für PTLD

Verschiedene Gruppen haben in den vergangenen Jahren EBV-EliSpot-Analysen an Blutproben von pädiatrischen Patienten nach Transplantation von soliden Organen durchgeführt. So führten Smets und Mitarbeiter prospektiv Messungen an 45 lebertransplantierten Kindern durch [40]. 7/45 Patienten entwickelten eine PTLD im Untersuchungszeitraum. Alle 7 PTLD-Patienten zeigten niedrige Frequenzen EBV-spezifischer T-Lymphozyten bei deutlich erhöhter EBV-Viruslast im Blut zum Zeitpunkt der Diagnose. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass ein Quotient aus der höchsten gemessenen EBV-Viruslast im Rahmen der Primärinfektion und der gleichzeitig bestimmten EBV-spezifischen T-Lymphozyten von > 1 die Diagnose einer PTLD mit einem positiven Vorhersagewert von 100% antizipiert hätte [40]. Macedo und Mitarbeiter berichten über 45 herz-, lungen- bzw. herz-lungentransplantierten Kinder, bei denen sowohl EBV-Elispot-Analysen als auch FACS-Analysen durchgeführt wurden. Hier zeigten sich erhöhte EBV-spezifische T-Lymphozyten bei Patienten mit chronisch nachweisbarer EBV-Viruslast im Blut gegenüber solchen ohne nachweisbare Viruslast. Bei Patienten mit hohen Viruslasten zeigten sich zudem Zeichen der „zellulären Erschöpfung“ in der FACS (Expression von *programmed death 1⁺/CD127⁻*), also T-

Zellen, die zwar EBV-antigenspezifisch waren, ihre zytotoxische Aktivität jedoch vermindert erschien [41].

1.5. Ziel der vorliegenden Arbeit

Die regelmäßige Kontrolle der Epstein-Barr-Viruslast ist bislang die einzige Möglichkeit der Früherkennung der PTLD. Mit der vorliegenden Arbeit hoffen wir, zum besseren Verständnis der Zusammenhänge zwischen latenter EBV-Infektion, EBV-spezifischer T-Zell-Immunität und der Lymphomentstehung beizutragen.

Wir formulierten folgende Arbeitshypothesen: 1. Es besteht ein Zusammenhang zwischen EBV-Viruslast und CD8+ Immunantwort 2. Es bestehen Unterschiede in der EBV-spezifischen T-Zell-Immunität zwischen asymptomatischen Patienten nach Herztransplantation im Kindesalter und solchen, die bereits an einer PTLD erkrankt waren. 3. Es bestehen Unterschiede zwischen Patienten, die mit unterschiedlichen immunsuppressiven Medikamenten behandelt werden. 4. Es ist möglich, die Methode EliSpot auf alle Probanden (auch auf die jüngsten) dieser Patientenpopulation anzuwenden.

2. Methoden

2.1. Studienpopulation

Zwischen August 2009 und September 2013 rekrutierten wir 61 Patienten, welche im Alter von <18 Jahren eine Herztransplantation erhalten hatten. Ausschlusskriterien waren Alter von > 28 Jahren, eine aktive Infektion zum Untersuchungszeitpunkt, das Fehlen einer aktuellen Epstein-Barr-Viruslastbestimmung zum Untersuchungszeitpunkt (4 Patienten) sowie das Fehlen eines Nachweises einer Infektion mit EBV (e.g. mindestens 1 nachweisbare Viruslast oder positive Serologie, 8 Patienten). Als Grenzwert für akzeptable Aktualität einer Viruslast wurden +/- 50 Tage festgelegt.

2.2. Patientenaufklärung und Ethikvotum

Die Patienten und/oder ihre Eltern wurden über die Teilnahme an der vorliegenden Studie durch eine Patienteninformation aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis. Ein Ethik-Votum der Ethikkommission Berlin (Charité) mit der Nummer EA2/147/10 lag vor.

2.3. Blutentnahme

Die Blutentnahme für die vorliegende Studie erfolgte im Rahmen von stationären oder ambulanten Nachsorgeterminen nach Herztransplantation durch die betreuende Abteilung. Das Blut wurde nur im Rahmen routinemäßig durchgeführter Blutabnahmen gewonnen, es erfolgte keine zusätzlichen Blutentnahmen nur für Studienzwecke. Neben allgemeinen Laborparametern wie Blutbild und Serumelektrolyten wurden routinemäßig die Serumspiegel der jeweiligen Immunsuppressiva sowie die EBV-Viruslast mittels quantitativer *real-time*-Polymerasekettenreaktion (rtPCR) bestimmt. Für die Durchführung des EliSpot-Assays wurden weitere 4-8ml Vollblut gewonnen und binnen 2 Stunden weiterverarbeitet.

BD Vacutainer® CPT™ Röhrchen Vor Zentrifugieren Nach Zentrifugieren

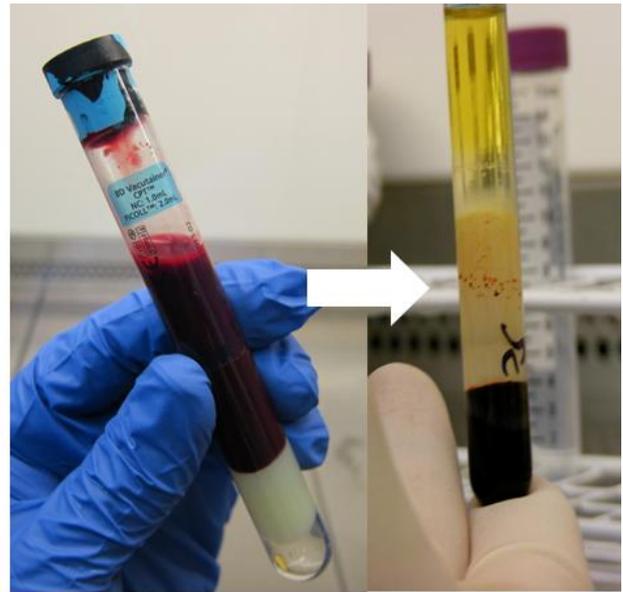
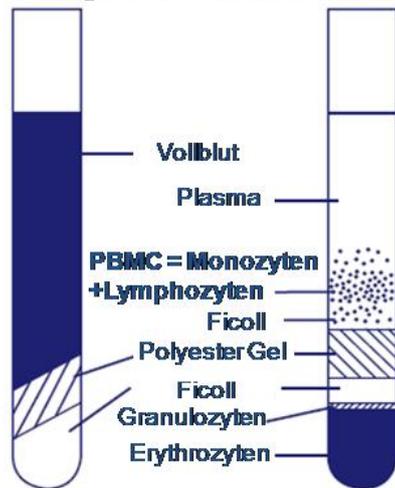


Abb. 1: Blutentnahmeröhrchen Vacutainer® CPT™ der Firma BD zur Dichtegradientenseparation von PBMC (monozytischen Zellen) von Granulozyten und Erythrozyten. Schematische Darstellung und Fotografien vor und nach Zentrifugieren. Nach: Gebrauchsanleitung für „BD Vacutainer® CPT™ Cell Preparation Tube“ mit Natrium Heparin nach der FICOLL-Methode: Information: www.bd.com/vacutainer/pdfs/bd_cpt_VDP40105.pdf

2.4. Durchführung des EliSpot-Assays

2.4.1. Versuchsprinzip

Im EliSpot-Assay werden monozytische Zellen aus dem peripheren Blut eines Probanden (im Weiteren PBMC für engl. *Peripheral Blood Monocytic Cells*) isoliert (Siehe Abbildung 1) und mit Proteinen des latenten und lytischen Zyklus des Epstein-Barr-Virus stimuliert. EBV-spezifische CD8+ T-Zellen reagieren dann mit der Ausschüttung von Interleukinen wie z.B. Interferon Gamma, welches mit einem Färbeantikörper nachgewiesen wird. Es entstehen Flecken (engl. *Spots*), wobei jeder Spot genau einer durch EBV-Antigene stimulierbaren T-Zelle entspricht. So lässt sich die spezifische T-Zell-Antwort eines Probanden gegen Epstein-Barr-Virus quantifizieren.

Für den eigentlichen Versuch wird eine 96-Loch-Platte benötigt, deren Wells mit einem Primärantikörper gegen das Zytokin Interferon Gamma (INF- γ) beschichtet sind. Wir verwendeten Kits der Firma AID – Autoimmun Diagnostika GmbH (Straßberg, Deutschland), die neben den entsprechend präparierten Platten auch den an alkalische Phosphatase gekoppelten (=biotinylierten) Zweitantikörper (Färbeantikörper), einen Waschpuffer und die Färbereagenz BCIP enthalten. Die EBV-Peptid-Lösungen bezogen

wir ebenfalls von der Firma AID. Für eine schematische Darstellung der Funktionsweise des EliSpot-Assays siehe Abbildung 2.

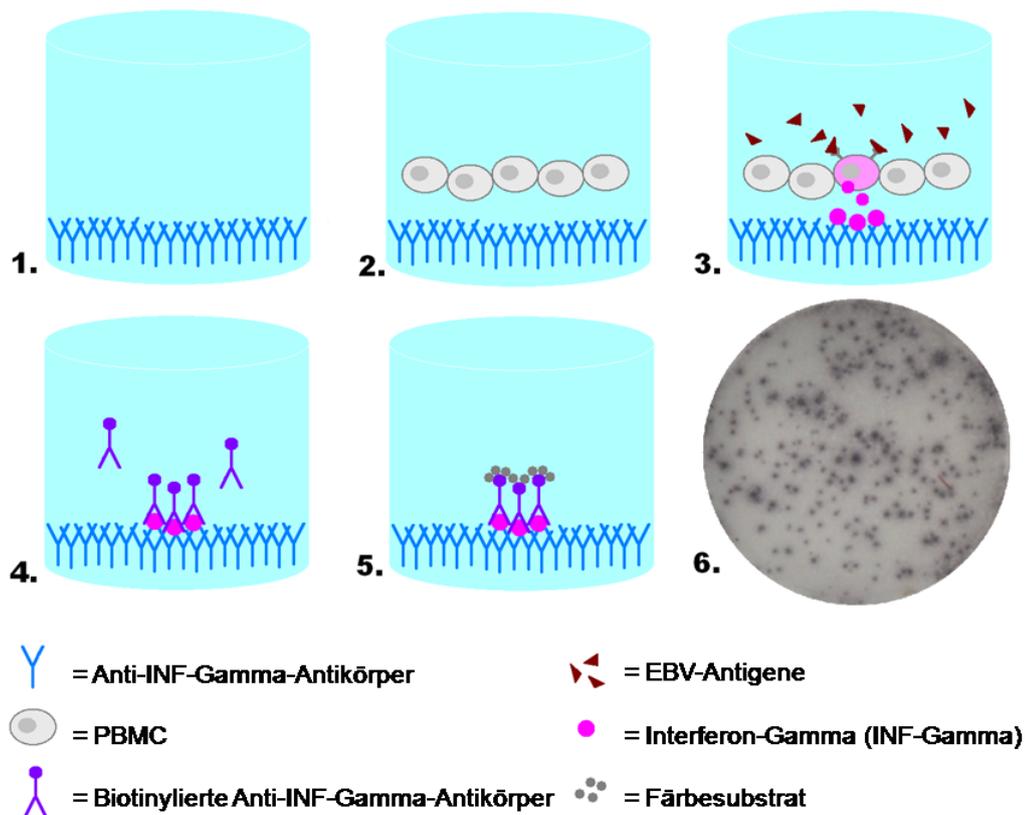


Abb. 2: Schematische Darstellung der Funktionsweise des EliSpot-Assay. 1.-5. zeigen den Versuchsablauf auf Niveau einer einzelnen Vertiefung einer 96-Well-Platte. 6. zeigt die Aufsicht auf eine solche Vertiefung durch den EliSpot Reader. Nach einer Flash-Präsentation auf www.immunospot.com der Firma Cellular Technology Limited. INF = Interferon. PBMC = Peripheral Blood Monocytical Cells (entspricht Monozyten und Lymphozyten).

2.4.2. Versuchsprotokoll

Von jedem Patienten wurden 4-8ml Vollblut in spezielle Blutentnahmeröhrchen (BD Vacutainer[®]CPT[™], BD, Heidelberg, Deutschland) abgenommen, welche neben Heparin eine Schicht aus Polyester Gel und 2 ml FICOLL[™] enthielten. Mittels FICOLL-Dichtegradientenseparation (Zentrifugieren für 25 Minuten bei 3500 U/min, Bremse ausgeschaltet) wurden die monozytären Zellen (PBMC) von den restlichen Blutbestandteilen getrennt. Anschließend wurde der PBMC enthaltende Überstand in ein 15ml Falcon[™]-Röhrchen (BD, Heidelberg, Deutschland) überführt (Abb. 1).

Die Zellen wurden zweimalig gewaschen, zunächst in 15ml PBS und dann in 11ml Kulturmedium (RPMI 1640 + 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 6,25mmol/l L-Glutamine). Hierzu wurde jeweils für 10 Minuten mit 1500 U/min

zentrifugiert, die Überstände dekantiert und anschließend das Zell-Pellet resuspendiert, zuletzt in 1000µl Kulturmedium. Die Zellen der so gewonnenen Zellsuspension wurden unter dem Mikroskop mittels Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gezählt und die Suspension durch Hinzugabe von Kulturmedium auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Die 96-Well-Platte, die Anti-Interferon-Gamma-Antikörper an ihrem Boden gebunden hat, wurde wie folgt präpariert: Pro Patient wurden 8 Wells befüllt (Pipettierschema siehe Abbildung 3 links). 2 Wells mit Peptiden aus dem latenten Zyklus des Epstein-Barr Virus (verschiedene Sequenzen von EBNA3a, LMP2), 2 Wells mit solchen des lytischen Zyklus (BMLF1, BRLF1, BZLF1, ZEBRA), 2 Wells mit Mitogen (Pokeweed) als Positivkontrolle sowie 2 weitere Wells mit lediglich RPMI 1640 als Negativkontrolle.

Anschließend wurden alle Wells mit je 100µl der Zellsuspension (2×10^5 Zellen/Well) überschichtet und für mindestens 17 Stunden bei 37° und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurden die Platten 6 x mit Waschpuffer gewaschen und anschließend nach Hinzugabe des Sekundärantikörpers (an alkalische Phosphatase gebundener Anti-INF-γ-Antikörper) erneut für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Hinzugabe von BCIP wurde die Färbereaktion gestartet und nach 7 Minuten durch mehrmaliges Waschen mit destilliertem Wasser beendet.

Zuletzt wurden die so hervorgerufenen Spots unter Verwendung des EliSpot Reader System™ der Firma AID gezählt. Fehlerhafte Zählungen (z.B. bei Verunreinigungen der Wells) wurden von Hand korrigiert (siehe Abbildung 3).

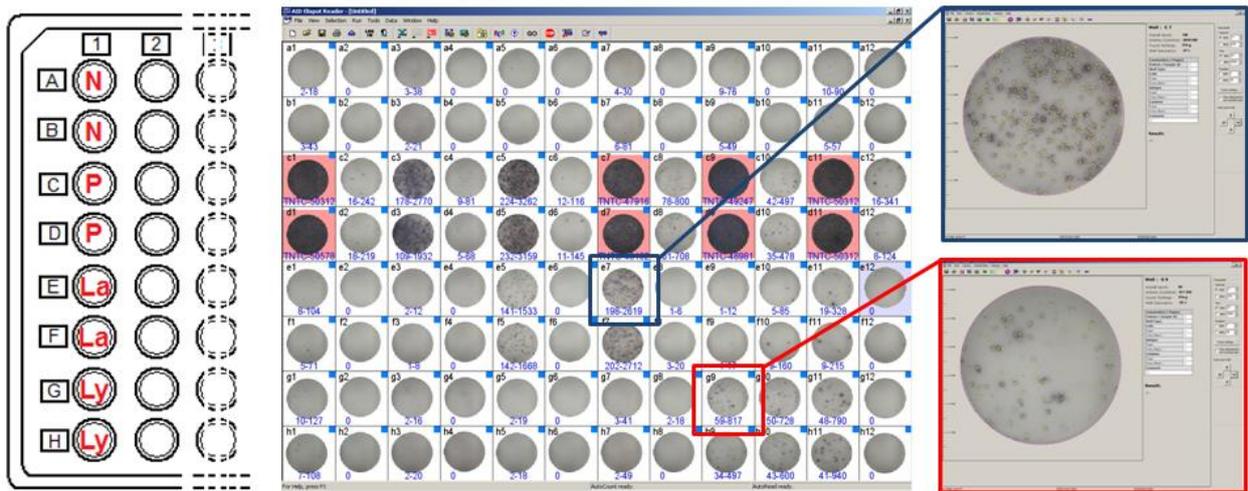


Abb. 3: Links: Pipettierschema für jeden Probanden. N = Negativkontrolle, P = Positivkontrolle, La = Latent, Ly = Lytisch. Mitte: Ansicht der Ergebnisse der Messung einer gesamten 96-Well-Platte im EliSpot Reader System™. Dargestellt sind die Ergebnisse für 6 Patienten, jeweils durch einen leeren Riegel getrennt. Rechts: Hervorgehoben je ein Well der latenten und der lytischen Stimulation.

2.4.3. Materialien

Gerätschaften

- Bio-Fuge® primo (Zentrifuge) Heraeus, Hanau, Deutschland
- Brutschrank (37°C) Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
- EliSpot Reader System™ AID Diagnostika, Straßberg, Deutschland
- Phasenkontrastmikroskop Axiovert 40 CFL Zeiss, Jena, Deutschland
- Sterile Werkbank Laminair Heraeus, Hanau, Deutschland

Chemikalien

- EliSpot Assay Kit mit (Anti-INF-Gamma beschichtete 96-Loch-Platte, EBV-Peptidmixe, biotinylierte Zweitantikörper, Färbereagenz BCIP) AID Diagnostika, Straßberg, Deutschland
- Phosphate Buffer Solution (PBS) Biochrom, Berlin, Deutschland
- RPMI 1640 Biochrom, Berlin, Deutschland
- Penicillin / Streptomycin Biochrom, Berlin, Deutschland
- L-Glutamin Biochrom, Berlin, Deutschland

2.5. Bestimmung der Epstein-Barr-Viruslast mittels quantitativer rtPCR

Die Bestimmung der EBV-Viruslast eines Patienten zum Zeitpunkt des EliSpot-Tests erfolgte im virologischen Labor der Charité Berlin mittels *real time* Polymerasekettenreaktion (rtPCR). Hierbei handelt es sich um eine Methode zur quantitativen Bestimmung von DNA-Kopien. Eingesetzt wurden ca. 1,5 ml EDTA-Blut.

In einem ersten Schritt wurde die gesamte in einer Blutprobe enthaltene DNA durch Erhitzen auf 94-96° C hydrolysiert, das heißt in Einzelstränge aufgetrennt (1. Schritt: Denaturierung). Anschließend wurde die Probe abgekühlt, was die Anlagerung spezifischer Primer erlaubt. Im Falle von EBV sind dies Nukleinsäurestränge, die dem für das EBER-Protein kodierenden Fragment der EBV-DNA entsprechen (2. Schritt: Primerhybridisierung). Der Versuchsansatz enthielt eine hitzebeständige DNA-Polymerase (TaqMan). Nach erneutem Erwärmen auf etwa 70° C begann diese am 3'-Ende des Primers mit der Synthese neuer Stränge von EBV-DNA (3. Schritt: Elongation).

Diese drei Schritte können in entsprechenden Automaten beliebig oft wiederholt und die Ziel-DNA vermehrt werden. Hierbei wurde außerdem bei jedem Durchlauf ein vorher beigefügter Farbstoff (FAM) von einem sogenannten *Quencher* (engl.: Löscher, TAMRA) getrennt und damit aktiviert. Die Zunahme des Farbstoffes wurde gemessen und ist proportional zur Anzahl der vermehrten DNA-Fragmente. Die Anzahl der Zyklen, die bis zu dem Erreichen eines festgelegten Schwellenwertes der Fluoreszenzaktivität erfolgt sind, wurden als Ct-Wert angegeben. Durch Vergleich mit dem Ct-Wert eines Standards (Namalwa Burkitt Lymphom Zelllinie) wurde die Anzahl der EBV-DNA-Kopien in der Patientenprobe errechnet.

Bis Januar 2010 war die Angabe als Kopien EBV-DNA/ μ g DNA gebräuchlich. Bei 3 Patienten unserer Kohorte liegen uns die Werte noch in dieser Darstellungsform vor. Mittlerweile erfolgt die Angabe als Kopien von EBV-DNA/ml Blut. In Rücksprache mit dem durchführenden Labor multiplizierten wir die älteren Werte mit dem Faktor 3, um eine Vergleichbarkeit zwischen den Messwerten zu ermöglichen.

2.6. Aufbereitung der Messergebnisse und statistische Auswertung

Es erfolgten für jeden Probanden Doppelbestimmungen. Die weiteren Berechnungen erfolgten mit dem Mittelwert beider Ergebnisse. Von den gemessenen Spots in den Wells mit latenter bzw. lytischer Stimulation wurden die Spots in der Negativkontrolle

subtrahiert. Die Zählergebnisse aus dem EliSpot (Anzahl Spots pro Well) wurden zur besseren Vergleichbarkeit auch mit anderen Publikationen auf die Angabe „Reaktive Zellen pro 1×10^6 PBMC“ umgerechnet. Da in unserem Versuchsansatz pro Well genau 2×10^5 Zellen eingesetzt wurden, mussten hierfür die Zahl der ermittelten Spots lediglich mit dem Faktor 5 multipliziert werden.

Das Ergebnis wird im Weiteren als „Fleckbildende Einheiten“, bzw. als SFU für engl: *Spot Forming Units* angegeben. (Beispiel: 10 Spots auf 200,000 Zellen in dem Well, in dem mit lytischen Antigenen stimuliert wurde, entspricht 50 SFU pro 1×10^6 PBMC gegen lytische Antigene.)

Die Sammlung aller Patientendaten in pseudonymisierter Form sowie der erhobenen Messwerte aus aktuellen Laborbestimmungen, EBV-PCR sowie EliSpot erfolgte mittels Microsoft Excel 2010, die statistische Auswertung unter Verwendung von Mittelwert, Median mit Quartilsabstand, Mann-Whitney-Test, „Spearman Rho“ (Rangkorrelationskoeffizient) und Fisher's Exact Test mittels Graphpad Prism Version 5.

3. Ergebnisse

3.1. Studienpopulation

Von 61 rekrutierten Patienten konnten 49 in die Studie eingeschlossen werden. 4/61 Patienten wurden ausgeschlossen, da keine aktuelle EBV-Viruslast zum Untersuchungszeitpunkt vorlag (Grenzwert +/- 50 Tage), 8 weitere Patienten, da kein Nachweis einer stattgehabten EBV-Infektion vorlag (Viruslast oder Serologie). Die vollständige Durchführung des EliSpot-Assays gelang bei 34 der 49 in die Studie eingeschlossenen Patienten mit Zustand nach Herztransplantation im Kindesalter. Für diese Patienten folgt im Weiteren die statistische Auswertung (siehe Abbildung 4). Es erfolgten insgesamt 64 Messungen, bei 9/34 führten wir 2 oder mehr Einzelmessungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch. Bei 11 der ursprünglich 49 Patienten konnten nicht genug PBMC isoliert werden, um den Versuch zu beginnen, bei 4 weiteren lagen technische Fehler oder Anwenderfehler vor, die die Analyse verhinderten (s.u.).

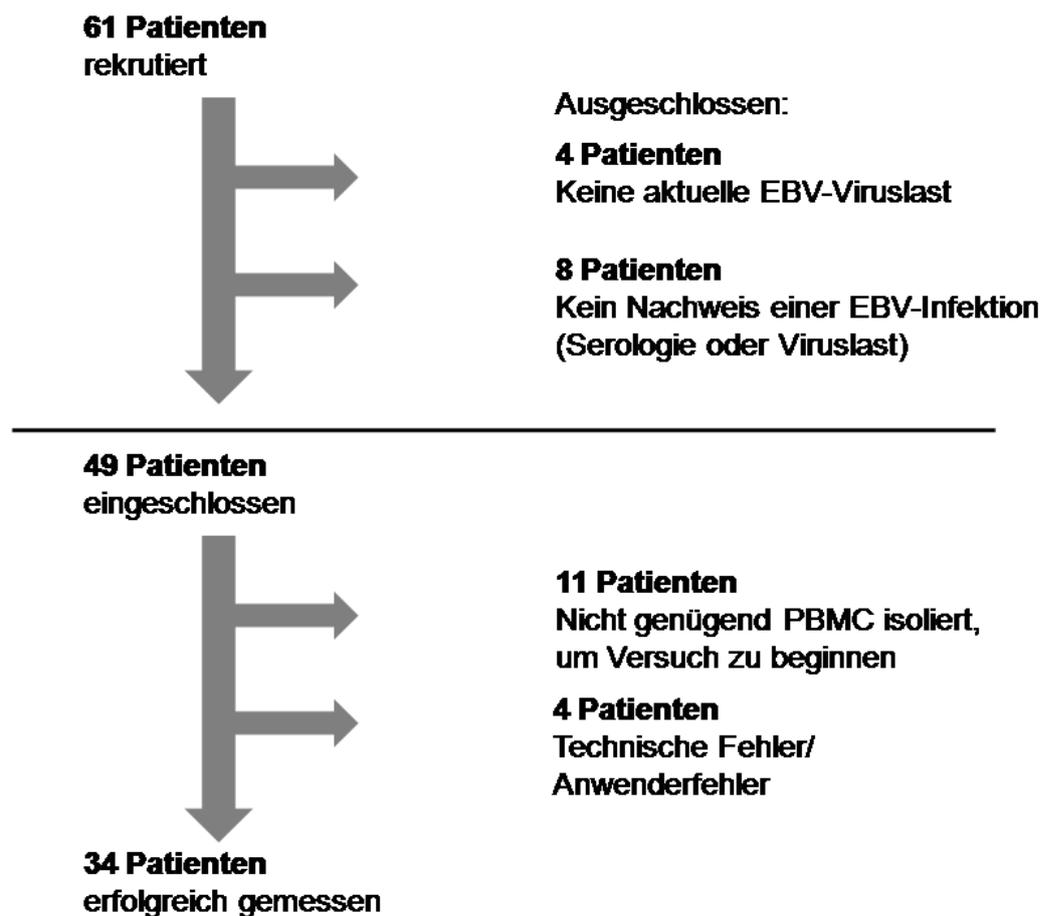


Abb. 4: Flussdiagramm zu Ausschlusskriterien der nicht in die Analysen eingegangenen Patienten

3.1.1. Basisdaten

Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung lag im Median bei 13,8 (10,3 – 21,4) Jahren. Die Zeitdifferenz zwischen Transplantation und Untersuchung lag bei 7,6 (5,1–10,1) Jahren. Das Alter zum Zeitpunkt der Herztransplantation hatte im Median bei 6,5 (2,2 – 12,2) Jahren gelegen. Von den untersuchten Patienten waren 15 (44,1%) männlich und 19 (55,9%) weiblich (siehe Tabelle 2).

3.1.2. Immunsuppression

Bei 14/34 Patienten (41,2 %) war eine Kombination aus Cyclosporin A (CyA) und Everolimus (Eve) verordnet, 7/34 (20,6%) erhielten Cyclosporin A und Mycophenolat Mofetil (MMF). Die übrigen 12 Patienten verteilen sich auf andere Therapieschemata (siehe Tabelle 2).

3.1.3. PTLD

9/34 Patienten dieser Studienpopulation hatten eine PTLD in der Anamnese. Das entspricht einer Prävalenz in dieser Kohorte von 26,5 %. Bei 5/9 Patienten wurde eine B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom diagnostiziert, bei den übrigen zeigten die Tumore eine polymorphe und polyklonale Histologie.

3.1.4. EBV-Status vor Transplantation

Daten zum EBV-Status der Patienten vor der Herztransplantation und der Organspender lagen lediglich in 4 Fällen komplett vor. Bei 2 weiteren Patienten war zumindest der EBV-Status vor Transplantation bekannt. Von diesen insgesamt 6 Patienten waren 3 vor der Transplantation EBV-naiv gewesen, ein Mismatch (Empfänger EBV-, Spender EBV+) lag in einem Fall vor. Hierbei handelte es sich nicht um einen Patienten mit PTLD in der Anamnese.

Tab. 2: Basisdaten aller gemessenen Patienten

	n = 34
Demographie	
Alter (Jahre)	13,8 (10,3 – 21,4)
Weiblich	19 [56%]
Größe (cm)	152,5 (127,0 – 175,0)
Gewicht (kg)	42,9 (21,0 – 60,3)
Alter (Jahre) bei Transplantation	6,5 (2,2 – 12,2)
Zeitdifferenz (Jahre) Tx und EliSpot	7,6 (5,1 – 10,1)
Immunsuppression	
Cyclosporin A +Everolimus	14 [41%]
Cyclosporin A + Mycophenolat Mofetil	7 [21%]
Tacrolimus + Mycophenolat Mofetil	3 [9%]
Tacrolimus + Everolimus	3 [9%]
Tacrolimus	2 [6%]
Cyclosporin A	2 [6%]
Everolimus + Mycophenolat Mofetil Cyclosporin + Azathioprin Tacrolimus + Azathioprin	Je 1 [3%]

Angaben als Median (Interquartilsbereich) bzw n [Prozent], Summe > 100% durch Rundung, Tx = Transplantation

3.2. Epstein-Barr-Viruslast

Die EBV-Viruslast aller analysierten Patienten (n=34) lag im Median bei 2190 Kopien/ml (0–201250). 14 Patienten (41,2%) wiesen zum Untersuchungszeitpunkt Viruslasten unterhalb der Nachweisgrenze von 1000 Kopien/ml auf, 9 Patienten (26,5%) hatten eine Viruslast zwischen 1000 und 7000 Kopien/ml, die übrigen 11 Patienten (32,4%) rangierten zwischen 20.100 und 3.400.000 Kopien/ml (siehe Abbildung. 5).

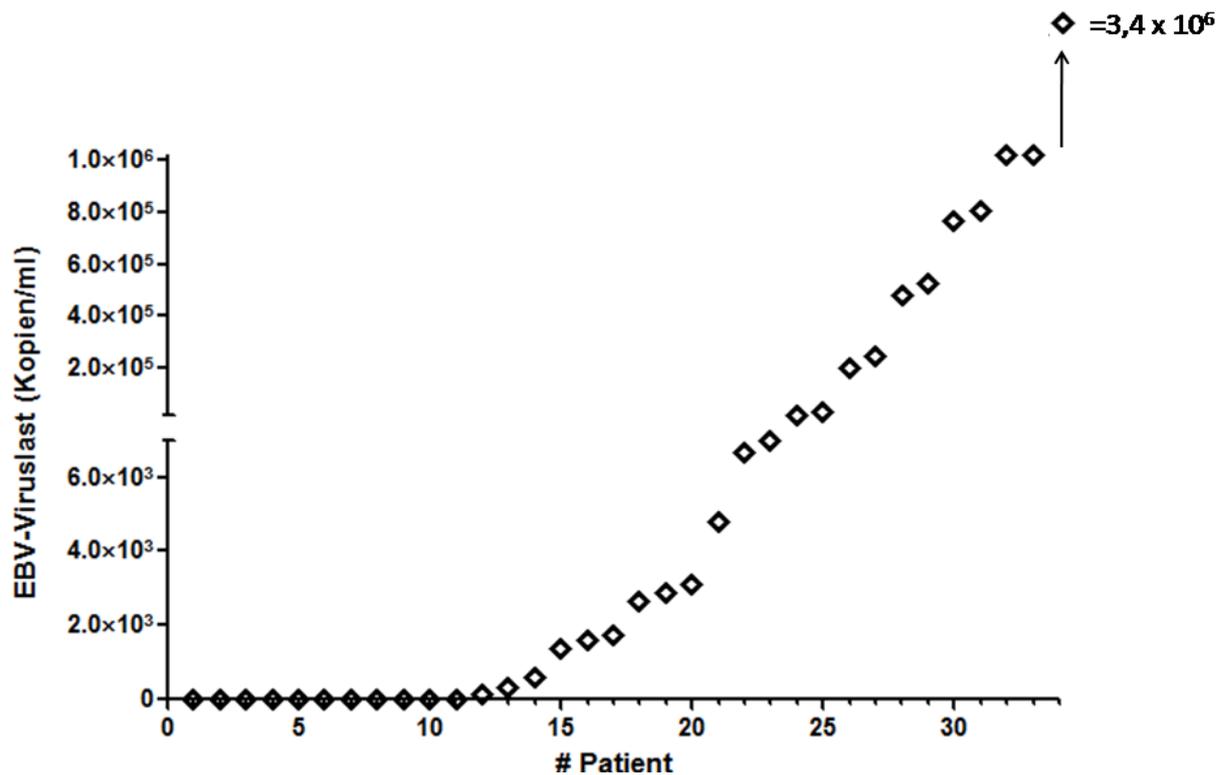


Abb. 5: Spektrum der EBV-Viruslasten (Kopien/ml) der analysierten Patienten (n=34).

Patienten, die zum Untersuchungszeitpunkt mit Cyclosporin A und MMF behandelt wurden, hatten signifikant niedrigere Viruslasten als Patienten, die Cyclosporin und Everolimus erhielten. Die beiden Gruppen waren hinsichtlich Alter, Geschlecht, Alter bei Transplantation, Zeitdifferenz zwischen Transplantation und EliSpot sowie Höhe der gemessenen Talspiegel von Cyclosporin A nicht verschieden (siehe Tabelle 3).

Patienten, die eine Erkrankung an PTLD in der Anamnese hatten, zeigten signifikant höhere Viruslasten als solche, die nie mit PTLD diagnostiziert worden waren. Die PTLD-Patienten waren außerdem zum Untersuchungszeitpunkt jünger und waren auch zum Zeitpunkt der Transplantation jünger gewesen (siehe Tabelle 4).

Tab. 3: Vergleich der immunsuppressiven Therapie (Cyclosporin A + Everolimus vs. Cyclosporin A + Mycophenolat Mofetil)

	Cyclosporin A + Everolimus (n=14)	Cyclosporin A + Mycophenolat Mofetil (n=7)	p
Alter (Jahre)	12,5 (9,5 – 19,8)	13,7 (7,7 – 19,1)	*0,85
Weiblich	7 [50%]	3 [43%]	+1,0
Alter (Jahre) bei HTx	5,9 (2,4 – 11,1)	12,2 (2,7 – 14,5)	*0,28
Posttransplantzeit (Jahre)	7,3 (5,1 – 9,3)	2,5 (0,2 – 12,3)	*0,18
Talspiegel (µg/l) Cyclosporin A	101,5 (75,3 – 130,5)	137 (82 - 195)	*0,15
EBV – Viruslast (Kopien/ml)	363500 (2998 – 857250)	0 (0 – 1626)	*0,0015

Angaben als Median (Interquartilsbereich) bzw. n [Prozent], *Mann-Whitney Test, +Fisher's Exact Test, Signifikanz als p < 0,05. HTx = Herztransplantation

Tab. 4: Vergleich von Patienten mit und ohne PTLD in der Anamnese

	PTLD in der Anamnese (n=9)	Keine PTLD In der Anamnese (n=25)	p
Alter (Jahre)	8,4 (7,8 – 12,4)	19,1 (12,5 – 22,8)	*0,0016
Weiblich	6 [67%]	13 [52%]	+0,7
Alter (Jahre) bei Transplantation	2,2 (0,7 – 6,1)	9,4 (2,8 – 13,9)	*0,003
Posttransplantzeit	6,7 (5,1 – 7,6)	8,9 (5,5 – 10,4)	*0,21
EBV – Viruslast (Kopien/ml)	245.000 (6825 – 7,9 x 10⁵)	333 (0 – 3955)	*0,0011

Angaben als Median (Interquartilsbereich) bzw. n [Prozent], *Mann-Whitney Test, +Fisher's Exact Test, Signifikanz als p < 0,05. PTLD = engl.: *Posttransplant lymphoproliferative disorder*

3.3. EBV-EliSpot

Die Angabe der Messergebnisse des EliSpot-Assay erfolgt in Form von sogenannten *Spot Forming Units* (SFU), also der reaktiven Zellen pro 1 Million PBMC. Der Median nach Stimulation mit latenten EBV-Antigenen lag bei 26,5 (11,8 – 138,8) SFU, der Median der Reaktion auf lytische Antigene bei 32,5 (0,75 – 164,5) SFU. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen EBV-Viruslast und der CD8+ T-Zellantwort auf latente oder lytische Antigene (siehe Abbildung 6).

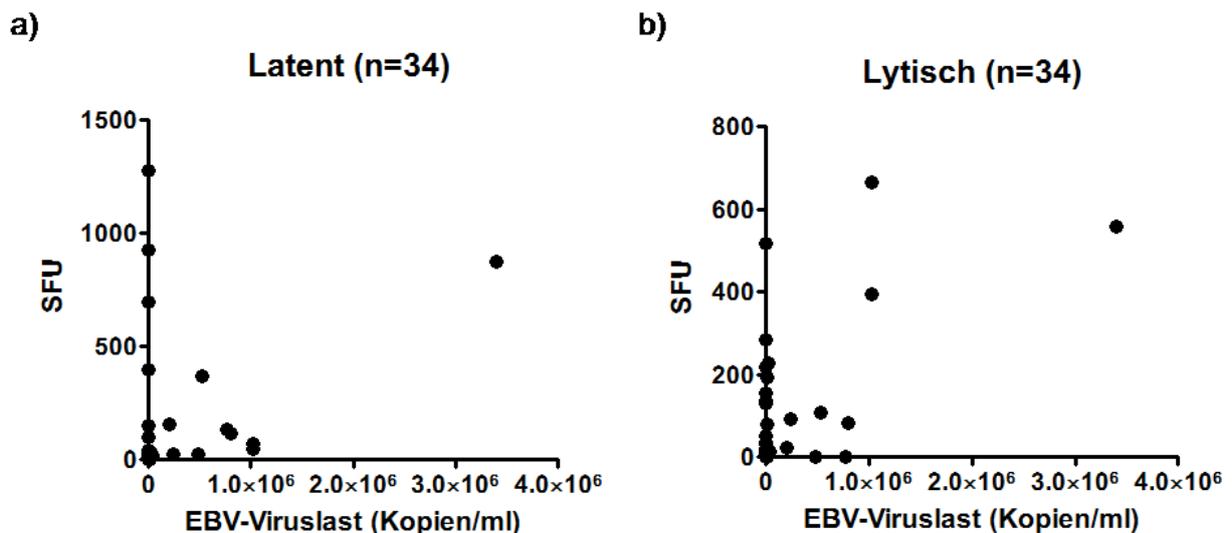


Abb. 6: CD8+ T-Zellantwort auf a) latente und b) lytische EBV-Antigene. Aufgetragen ist die EBV-Viruslast angegeben in Kopien/ml gegen die Anzahl von Spot Forming Units, also Reaktiven Zellen pro 1 Mio. Zellen. Es besteht keine Korrelation zwischen Viruslast und Immunantwort in der Gesamtkohorte (n=34 Patienten). Korrelationskoeffizient: a) $r=0,19$; b) $r=0,35$.

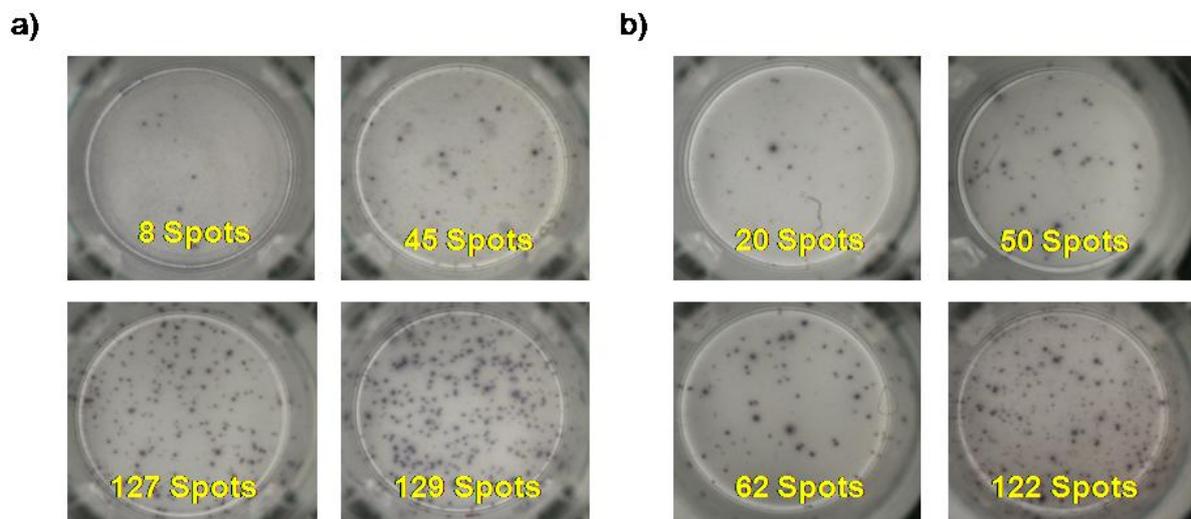


Abb. 7: Auswahl von je 4 Wells unterschiedlicher Probanden nach Stimulation mit a) latenten und b) lytischen Antigenen mit unterschiedlich starker Immunantwort.

3.4. Subgruppenanalyse

3.4.1. Vergleich zwischen Patienten mit hoher bzw. niedriger Viruslast

Wir verglichen Patienten mit „hoher Viruslast“ mit Patienten mit „niedriger Viruslast“ hinsichtlich ihrer spezifischen CD8+ T-Zellantwort auf latente bzw. lytische EBV-Antigene. Als Grenzwert für die Unterscheidung zwischen hoher und niedriger Viruslast wählten wir einen Wert von 2000 Kopien/ml und in einem zweiten Schritt 16000 Kopien/ml.

Bei Patienten mit Viruslasten > 2000 Kopien/ml zeigte sich ein Trend zu mehr SFU auf lytische Antigene ($p = 0,06$). Das Ansprechen auf latente Antigene war in beiden Gruppen nicht verschieden. Es zeigte sich außerdem ein signifikant stärkeres Ansprechen auf latente Antigene in der Gruppe der Patienten mit Viruslasten > 16.000 Kopien/ml (siehe Abb. 8 und 9).

Wurden aus dieser Analyse die Patienten ausgeklammert, die eine PTLD in der Anamnese hatten, zeigte sich für beide genannten Grenzwerte eine signifikant stärkere Immunantwort auf lytische Antigene bei Patienten mit hoher Viruslast im Vergleich zu solchen, mit niedrigerer Viruslast (Abb. 10 und 11)

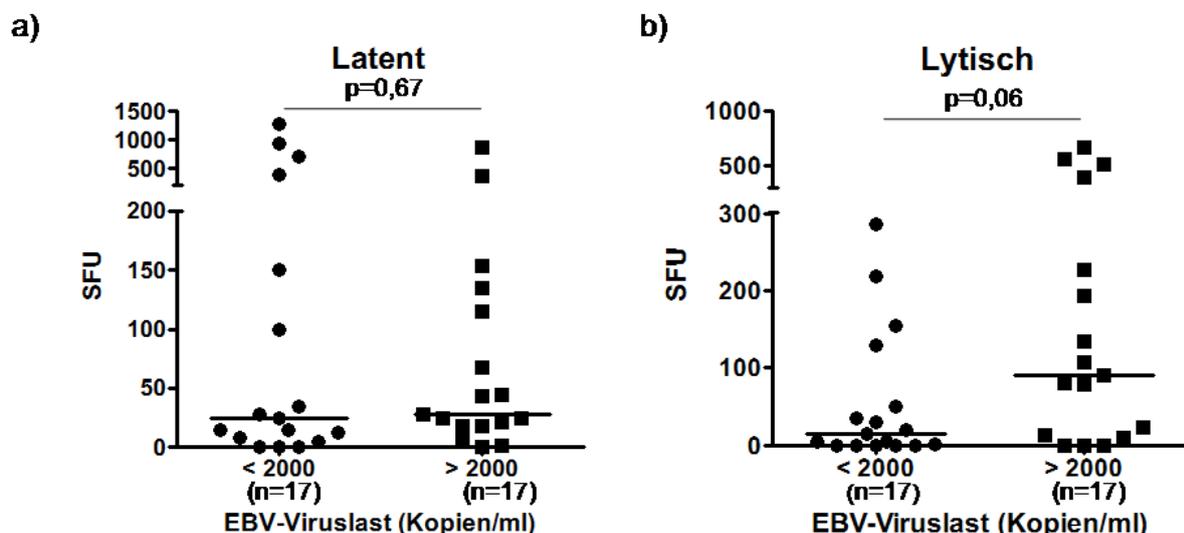


Abb. 8: Vergleich der Immunantwort (angegeben als Spot Forming Units, also reaktive Zellen pro 1 Mio. Zellen) auf Stimulation mit latenten und lytischen Antigenen bei Patienten mit hoher bzw. niedriger EBV-Viruslast. Als Grenzwert wurden hier 2000 Kopien/ml gewählt, die Linie markiert jeweils den Median. Angewandt wurde der Mann-Whitney-Test. a) Latent: Mediane 25,0 SFU (6,5 – 272,5) vs. 28,00 SFU (18,0 – 125,0), $p=0,67$; b) Lytisch: Mediane 15,0 SFU (0 – 90,0) vs. 90,0 SFU (11,5 – 309,5), $p=0,06$.

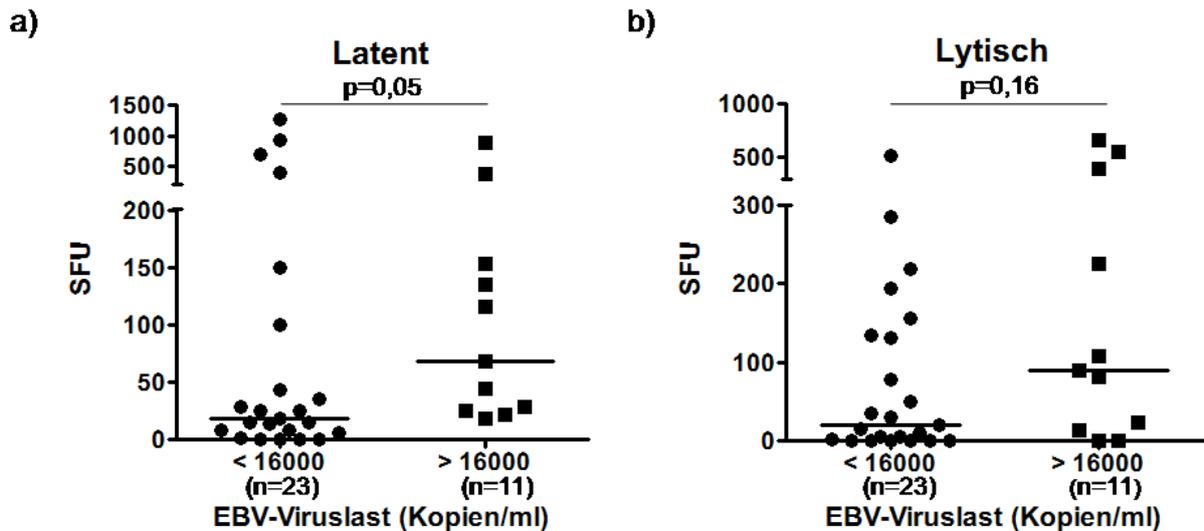


Abb. 9: Vergleich der Immunantwort (angegeben als Spot Forming Units, also reaktive Zellen pro 1 Mio. Zellen) auf Stimulation mit latenten und lytischen Antigenen bei Patienten mit hoher bzw. niedriger Viruslast. Als Grenzwert wurde hier 16000 Kopien/ml gewählt, die Linie markiert jeweils den Median. Angewandt wurde der Mann-Whitney-Test. a) Latent: Mediane 18,0 SFU (5,0 – 100,0) vs. 68,0 SFU (25,0 – 152,0), $p=0,05$; b) Lytisch: Mediane 20 SFU (0 – 134,0) vs. 90,0 SFU (13,0 – 393,0), $p=0,16$.

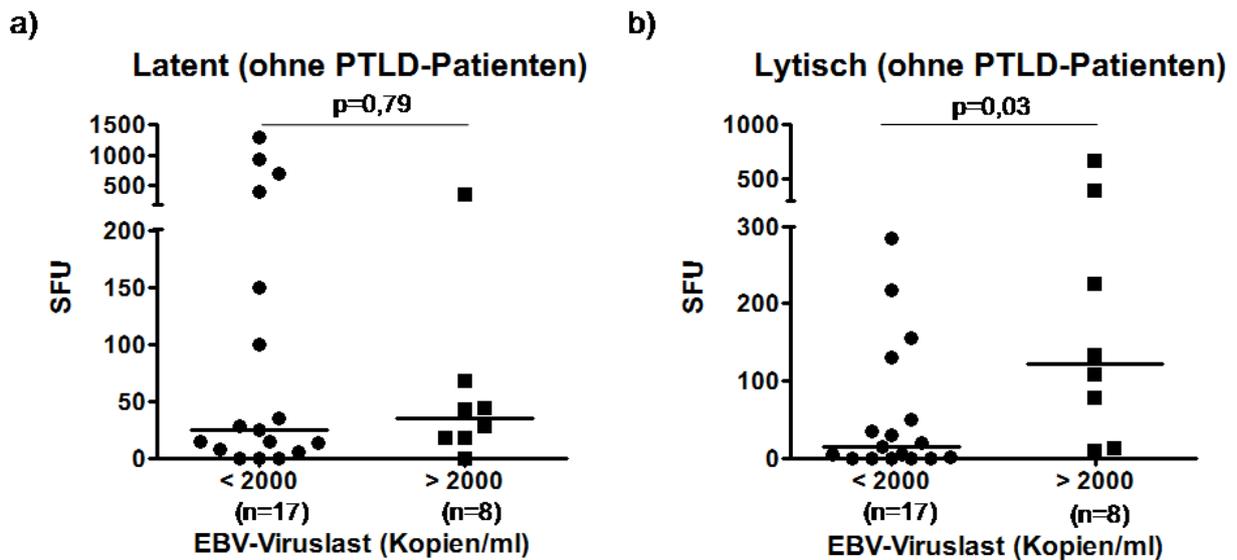


Abb. 10: Vergleich der Immunantwort (angegeben als Spot Forming Units, also reaktive Zellen pro 1 Mio. Zellen) auf Stimulation mit latenten und lytischen Antigenen bei Patienten mit hoher bzw. niedriger Viruslast. Als Grenzwert wurde hier 2000 Kopien/ml gewählt, die Linie markiert den Median. Patienten mit PTLD in der Anamnese wurden für diese Analyse ausgeklammert. Angewandt wurde der Mann-Whitney-Test. a) Latent: Mediane 25,0 SFU (6,5 – 272,5) vs. 35,5 SFU (18,0 – 62,0), $p=0,79$; b) Lytisch: Mediane 15,0 SFU (0 – 90,0) vs. 121,0 SFU (29,25 – 351,3), $p=0,03$.

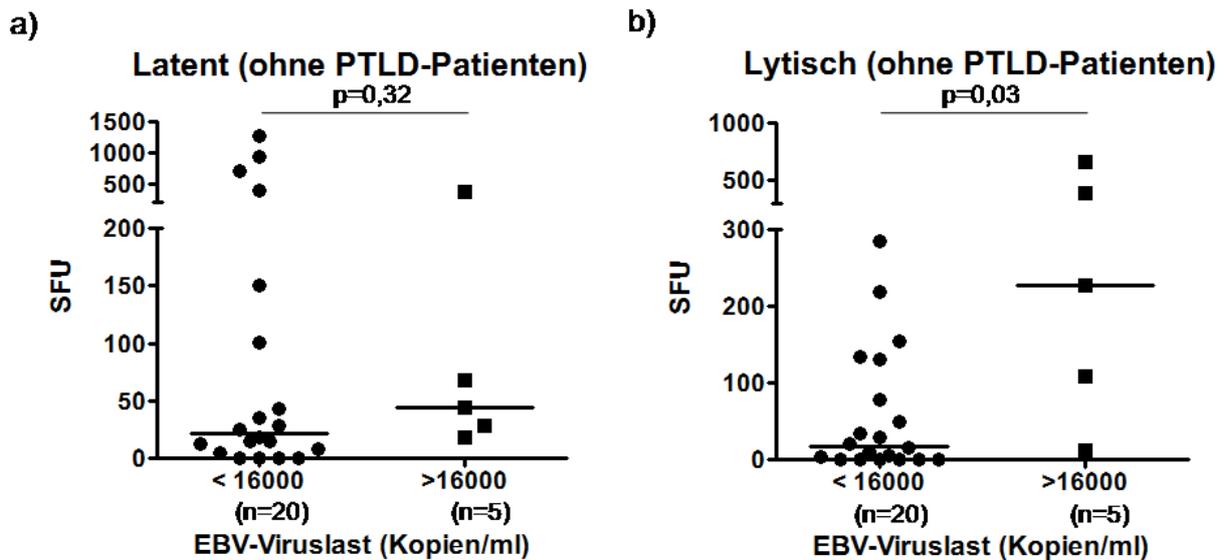


Abb. 11: Vergleich der Immunantwort (angegeben als Spot Forming Units, also reaktive Zellen pro 1 Mio. Zellen) auf Stimulation mit latenten und lytischen Antigenen bei Patienten mit hoher bzw. niedriger Viruslast. Als Grenzwert wurde hier 16000 Kopien/ml gewählt, die Linie markiert den Median. Patienten mit PTLD in der Anamnese wurden für diese Analyse ausgeklammert. Angewandt wurde der Mann-Whitney-Test. a) Latent: Mediane 21,5 SFU (5,8 – 137,5) vs. 44,0 SFU (23,0 – 219,0), $p=0,32$; b) Lytisch: Mediane 17,5 SFU (0,3 – 117,0) vs. 226 SFU (60,5 – 529,5), $p=0,03$.

3.4.2. Einflussfaktor PTLD

9/34 Patienten unserer Kohorte hatten eine positive Anamnese für PTLD. Diese Patienten hatten zum Untersuchungszeitpunkt signifikant höhere EBV-Viruslasten als Patienten ohne PTLD in der Anamnese (siehe Tabelle 4). Die beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich der CD8+ T-Zellantwort auf latente oder lytische EBV-Antigene (Abb. 12). Wir verglichen Patienten mit hoher Viruslast (> 16000 Kopien DNA/ml) mit und ohne PTLD in der Anamnese. Es zeigte sich ein vermindertes Ansprechen auf lytische Antigene in der Gruppe von Patienten mit hoher Viruslast zum Untersuchungszeitpunkt und PTLD in der Anamnese. Dieser Unterschied war nicht statistisch signifikant. Wurde das Untersuchungsergebnis eines Patienten mit besonders hoher Viruslast ($3,4 \times 10^6$ Kopien DNA/ml) aus der Untersuchung ausgeklammert, zeigte sich hier ein Trend hin zu einer verminderten Immunantwort auf lytische Antigene in dieser Gruppe (Abb. 13).

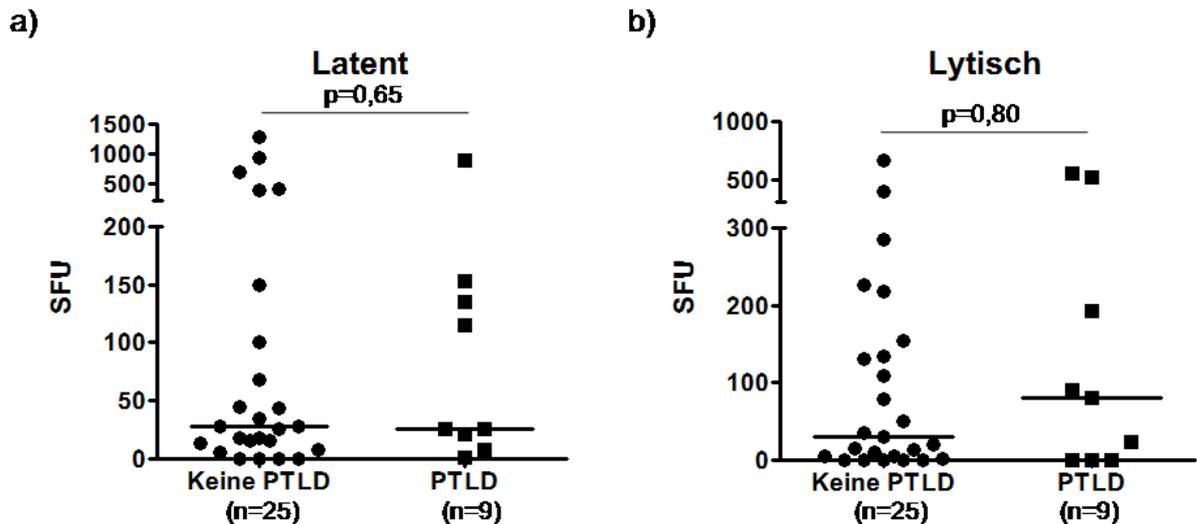


Abb. 12: Alle Patienten (n=34). Vergleich der CD8+ T-Zellantwort (angegeben als Spot Forming Units, also reaktive Zellen pro 1 Mio. Zellen) auf latente und lytische Stimulation zwischen Patienten mit und ohne PTLD in der Anamnese. Die Linie markiert den Median. Angewandt wurde der Mann-Whitney-Test. a) Latent: Mediane 28,0 SFU (10,5 – 125,0) und 25,0 SFU (14,5 - 144), p=0,65; b) Lytisch: Mediane 30,0 SFU (2,5 – 144,5) und 81,0 SFU (0 – 354,0), p=0,80.

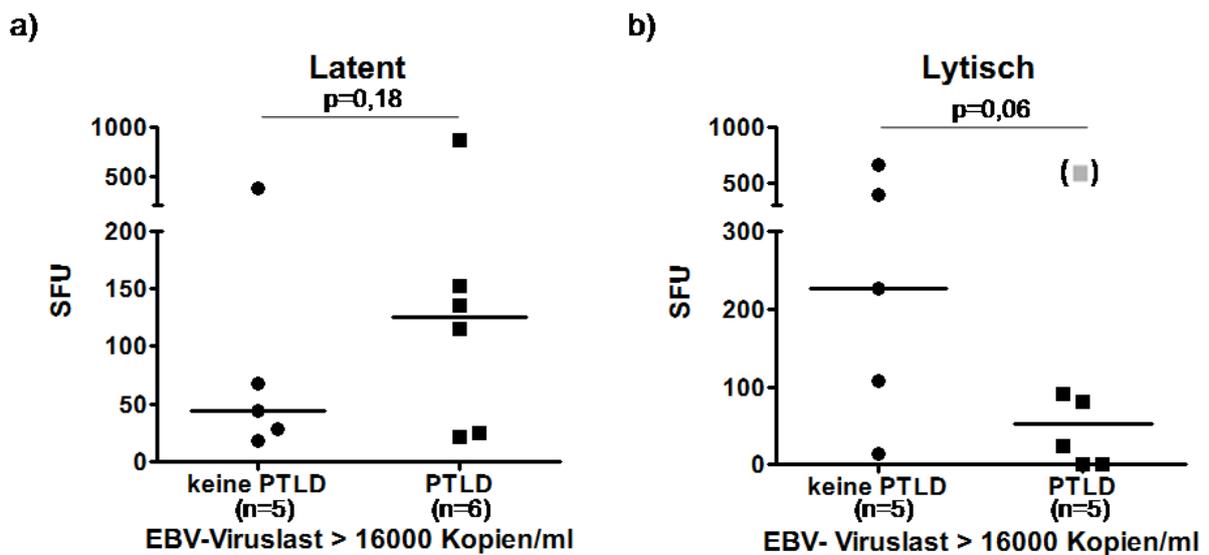


Abb. 13: Nur Patienten mit hoher Viruslast (> 16000 Kopien/ml). Vergleich der Immunantwort (angegeben als Spot Forming Units, also reaktive Zellen pro 1 Mio. Zellen) auf lytische Antigene zwischen Patienten mit und ohne PTLD in der Anamnese. Die Linie markiert den Median. Angewandt wurde der Mann-Whitney-Test. Für die Analyse in der Teilabbildung b) wurde ein Patient mit sehr hoher Viruslast ($3,4 \times 10^6$ Kopien/ml) und sehr hoher Immunantwort (558 SFU) als Ausreißer betrachtet und ausgeklammert. a) Mediane 226,0 SFU (60,5 – 529,5) und 52,0 SFU (0 – 207,0), p=0,18; b) Mediane 226,0 SFU (60,5 – 529,5) und 23,0 SFU (0 – 85,5), p=0,06.

3.4.3. Einfluss der immunsuppressiven Therapie auf den EliSpot

Wir verglichen zwei Gruppen mit unterschiedlicher immunsuppressiver Therapie (Cyclosporin + Everolimus (n=14) vs. Cyclosporin + MMF (n=7)) hinsichtlich ihrer CD8+ T-Zellantwort im EBV-EliSpot.

Patienten, die mit Cyclosporin A und Everolimus behandelt wurden, wiesen signifikant höhere EBV-Viruslasten auf als diejenigen, die Cyclosporin in Kombination mit Mycophenolsäure erhielten (s.o.). Diese Gruppe (CyA + Eve) zeigte außerdem eine stärkere T-Zellantwort, sowohl nach latenter wie nach lytischer Stimulation. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Abb. 14).

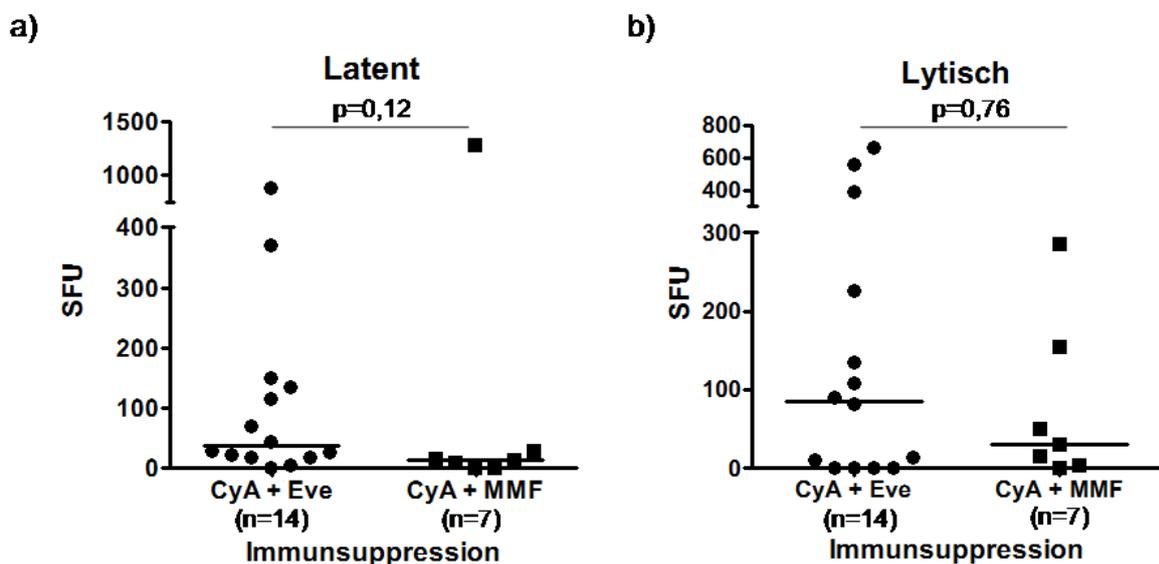


Abb. 14: Einfluss der immunsuppressiven Therapien auf die T-Zellantwort auf latente und lytische Antigene. Verglichen werden zwei Gruppen: Behandlung mit CyA + Eve vs. CyA + MMF. Jedes Quadrat bzw. jeder Punkt repräsentiert die Immunantwort (angegeben als Spot Forming Units, also reaktive Zellen pro 1 Mio. Zellen) eines Patienten auf latente oder lytische Stimulation. Die Linie markiert den Median. Angewandt wurde der Mann-Whitney-Test. Die EBV-Viruslast war im Median deutlich höher in der Gruppe der mit CyA + Eve behandelten: Median 363500 Kopien/ml (2998 – 857250) vs. CyA + MMF 0 Kopien/ml (0 – 1626), $p = 0,001$. a) Latent: Mediane 36,0 (18,0 – 138,8) SFU und 13,0 (0 – 28,0) SFU, $p=0,12$; b) Lytisch: Mediane 85,5 (0,8 – 267,8,0) SFU und 30,0 (4 – 155,0) SFU, $p=0,76$. CyA = Cyclosporin A, Eve = Everolimus, MMF = Mycophenolat Mofetil.

3.4. Serielle Messungen

Bei 9/34 Patienten erfolgten im Verlaufe der Studie wiederholte Messungen. 3/9 hatten eine PTLD in der Anamnese. Es zeigte sich bei allen Patienten über den Beobachtungszeitraum eine große Varianz der Viruslasten. Bei 6/9 Patienten war zu beobachten, dass die Immunantwort auf lytische Antigene dabei im Falle eines Anstieges der Viruslast in ähnlichem Maße zunahm. Bei einem Patienten mit PTLD in der Anamnese war der Zusammenhang umgekehrt: Die Anzahl an CD8+ T-Lymphozyten war zum Zeitpunkt stärkerer Virusreplikation vermindert. Die Immunantwort auf latente Antigene stand in beiden Gruppen in keinem eindeutigen Zusammenhang zur aktuellen Viruslast (siehe Abbildungen 15-20).

3.4.1. Patienten ohne PTLD in der Anamnese

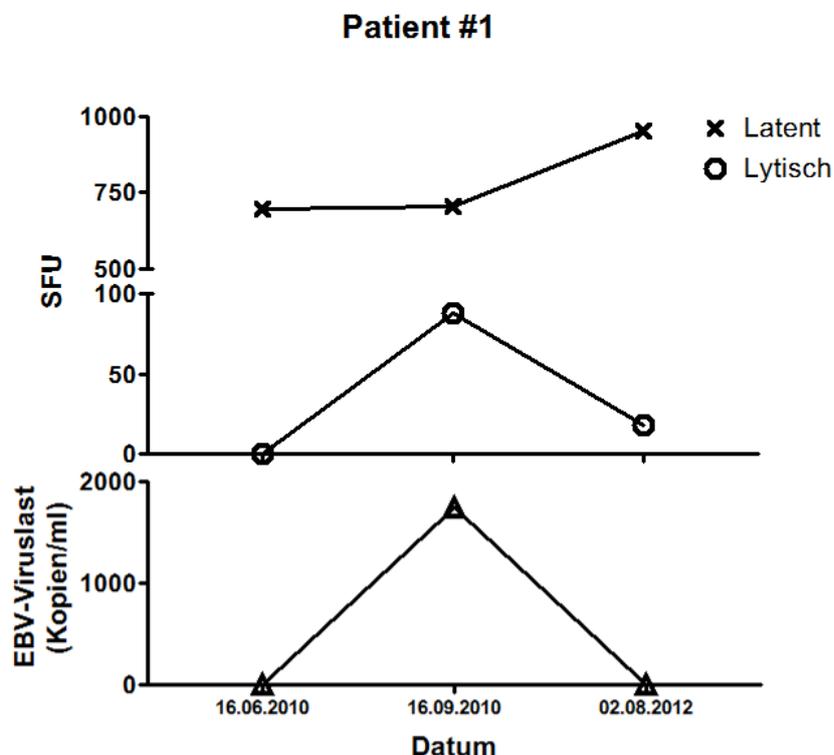


Abb. 15: Patient #1, keine PTLD in der Anamnese. Therapie mit Tacrolimus + MMF. Gezeigt sind die Epstein-Barr-Viruslasten (untere Grafik, Angabe in Kopien/ml) und die Immunantwort auf latente und lytische Antigene in Form von SFU (Spot forming units, Reaktive Zellen pro 1 Mio. Zellen) zu unterschiedlichen Messzeitpunkten. Bei Zunahme der Viruslast zeigte sich ein reziproker Anstieg der lytischen Immunantwort. EB-Viruslasten im Verlauf: 16.06.2010: negativ; 19.09.2010: 1740 Kopien/ml; 02.08.2012: negativ.

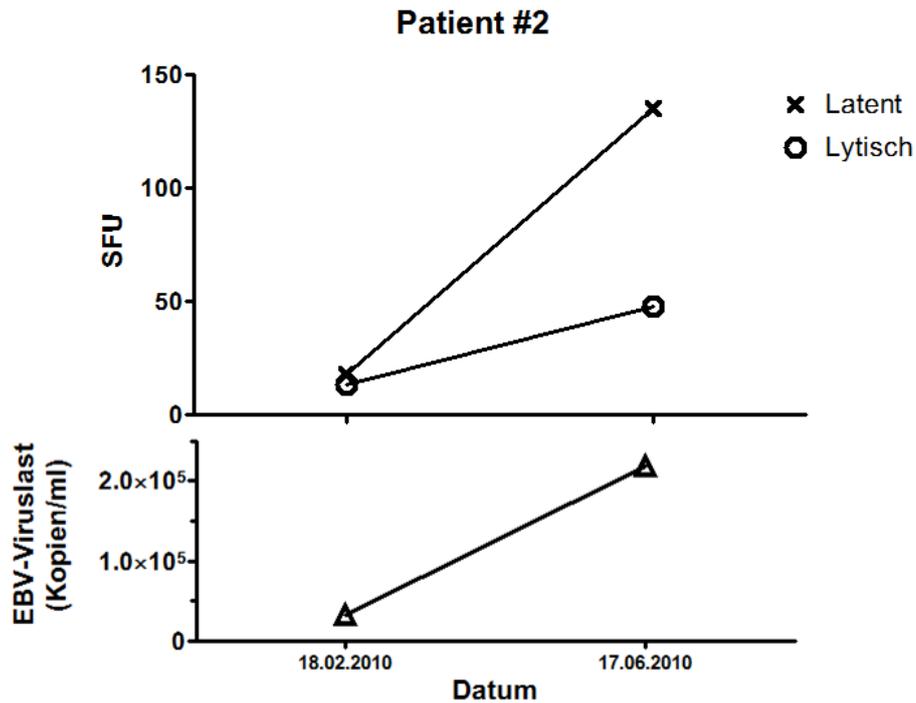


Abb. 16: Patient #2, keine PTLD in der Anamnese. Therapie mit Cyclosporin A + Everolimus. Gezeigt sind die Epstein-Barr-Viruslasten (untere Grafik, Angabe in Kopien/ml) und die Immunantwort auf latente und lytische Antigene in Form von SFU (Spot forming units, Reaktive Zellen pro 1 Mio. Zellen) zu unterschiedlichen Messzeitpunkten. Mit Anstieg der EBV-Last zeigte sich auch ein Anstieg der lytischen und latenten Immunantwort. EB-VirusLast: 18.02.2010: 32300 Kopien/ml, 17.06.2010: 219000 Kopien/ml.

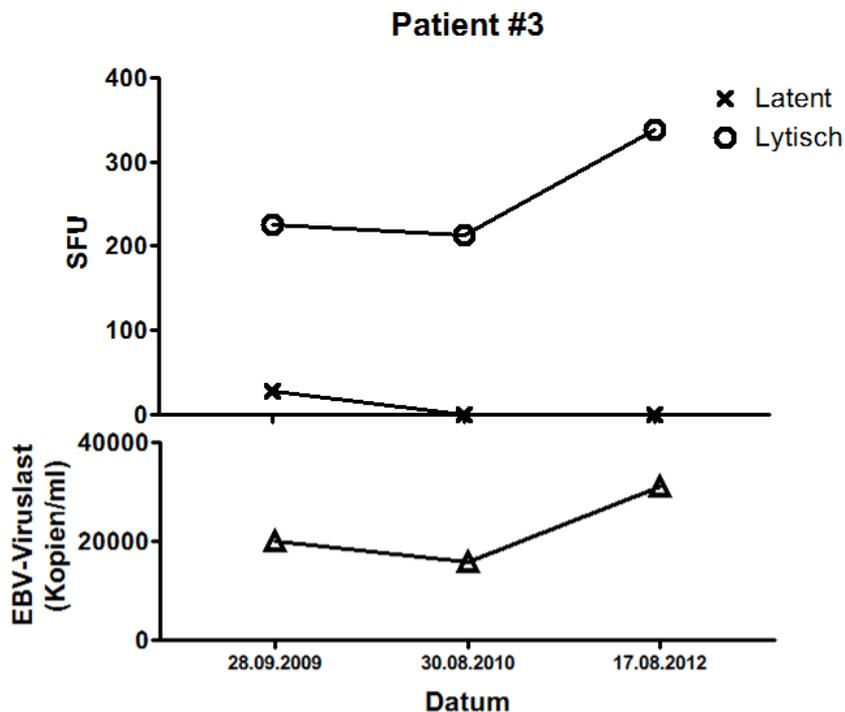


Abb. 17: Patient #3, keine PTLD in der Anamnese. Therapie mit Cyclosporin A + Everolimus. Gezeigt sind die Epstein-Barr-Viruslasten (untere Grafik, Angabe in Kopien/ml) und die Immunantwort auf latente und lytische Antigene in Form von SFU (Spot forming units, Reaktive Zellen pro 1 Mio. Zellen) zu unterschiedlichen Messzeitpunkten. Mit Anstieg der EBV-Last zeigte sich auch ein Anstieg der lytischen Immunantwort im EliSpot. Zwischen Viruslast und latenter Immunantwort bestand kein Zusammenhang.

EBV-Viruslast: 28.09.2009: 20100 Kopien/ml, 30.08.2010: 15800 Kopien/ml, 17.08.2012: 30900 Kopien/ml.

3.4.2. Patienten mit PTLD in der Anamnese

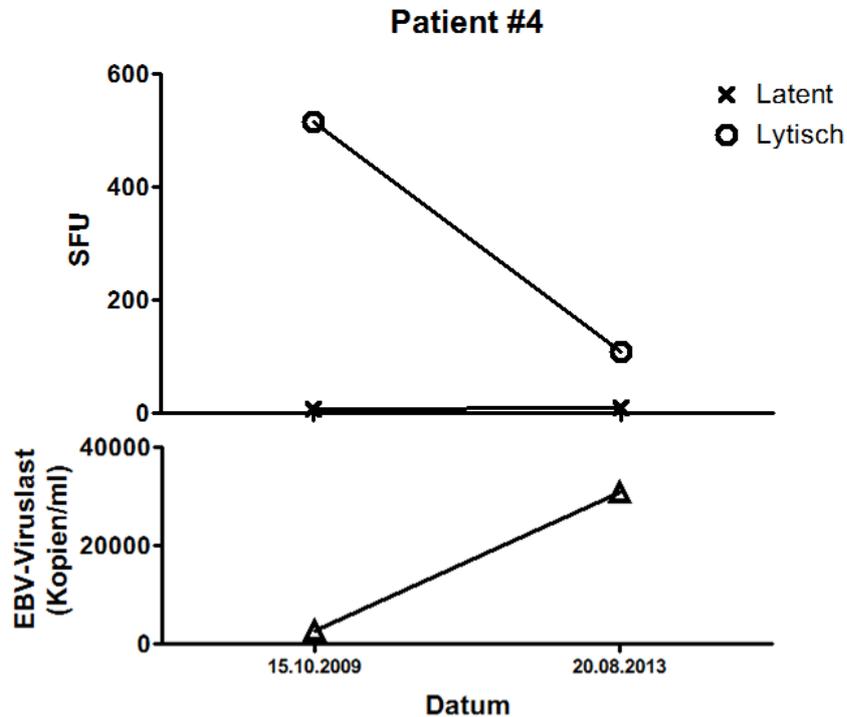


Abb. 18: Patient #4, PTLD in der Anamnese (B-Zell-Lymphom). Therapie 2009 mit Cyclosporin A, 2013 mit Tacrolimus + MMF. Gezeigt sind die Epstein-Barr-Viruslasten (untere Grafik, Angabe in Kopien/ml) und die Immunantwort auf latente und lytische Antigene in Form von SFU (Spot forming units, Reaktive Zellen pro 1 Mio. Zellen) zu unterschiedlichen Messzeitpunkten. Zum Zeitpunkt der höheren Viruslast zeigte sich eine verminderte Immunantwort auf lytische Antigene. Zwischen Viruslast und latenter Immunantwort bestand kein Zusammenhang. EB-Viruslasten: 15.10.2009: 2870 Kopien/ml, 20.08.2013: 30700 Kopien/ml.

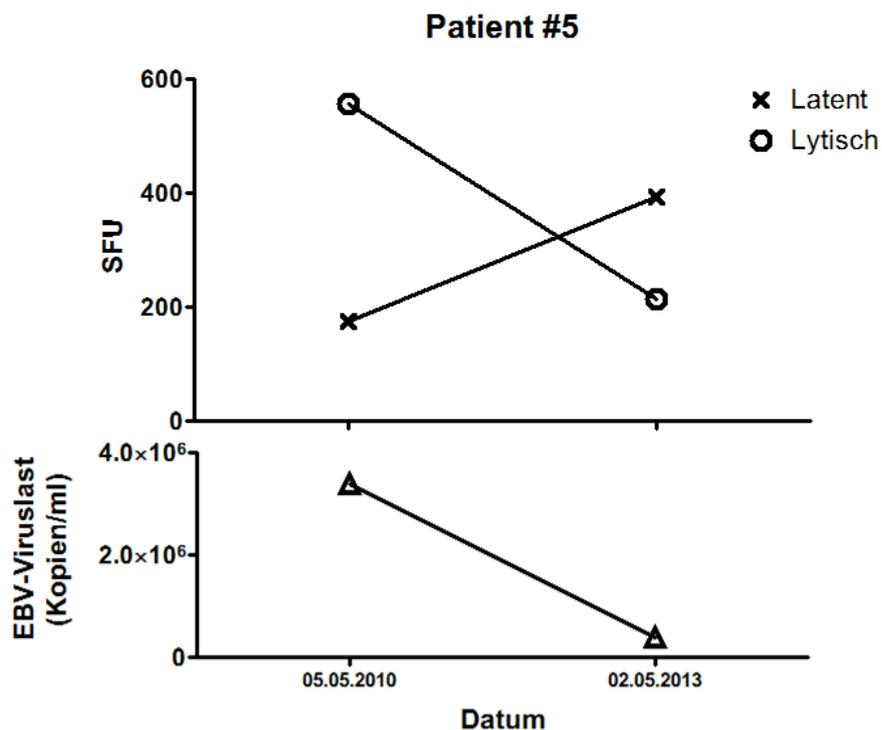


Abb. 19: Patient #5, PTLD in der Anamnese (Histologie: Polymorph/polyklonal). Therapie mit Cyclosporin A + Everolimus. Gezeigt sind die Epstein-Barr-Viruslasten (untere Grafik, Angabe in Kopien/ml) und die Immunantwort auf latente und lytische Antigene in Form von SFU (Spot forming units, Reaktive Zellen pro 1 Mio. Zellen) zu unterschiedlichen Messzeitpunkten. Bei Abfall der EBV-Last zeigte sich auch eine Reduktion der SFU gegen lytische aber nicht gegen latente EBV-Antigene. EB-Viruslasten: 05.05.2010: 3.400.000 Kopien/ml, 02.05.2013: 378.000 Kopien/ml.

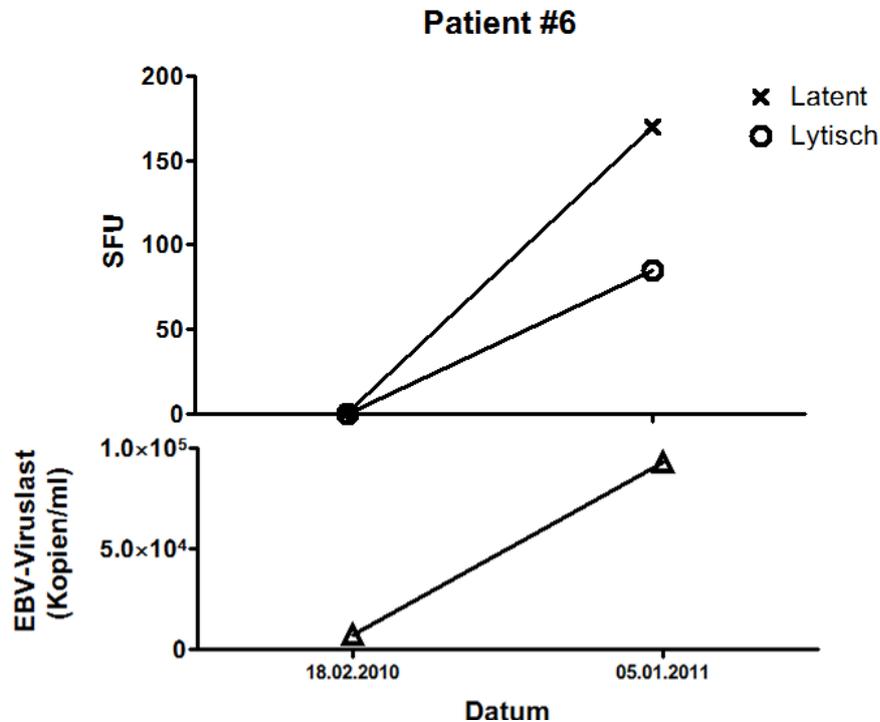


Abb. 20: Patient #6, PTLD in der Anamnese (Histologie: Polymorph/polyklonal). Gezeigt sind die Epstein-Barr-Viruslasten (untere Grafik, Angabe in Kopien/ml) und die Immunantwort auf latente und lytische Antigene in Form von SFU (Spot forming units, Reaktive Zellen pro 1 Mio. Zellen) zu unterschiedlichen Messzeitpunkten. Therapie 2010 mit Cyclosporin A, 2011 Cyclosporin A + Everolimus. Bei Anstieg der EBV-Last zeigte sich ein Anstieg der SFU gegen lytisches und latentes EBV-Antigen. EB-Viruslast: 18.02.2010: 7000 Kopien/ml, 05.01.2013: 92.600 Kopien/ml.

3.5. Auswertung nicht erfolgreicher Messversuche

In 48 Fällen konnte der EliSpot-Assay nicht erfolgreich zur Anwendung gebracht werden. Für 34 dieser Messversuche lagen ausreichende Daten zur statistischen Analyse der Gründe vor. In 25/34 Fällen (73,5%) konnten nicht ausreichend PBMC mittels Ficoll-Dichteseperation aus der Patientenblutprobe isoliert werden, um diese

- Erythrozyten oberhalb des Gels (1x)
- Gelreste im Überstand (2x)
- Spezialröhrchen bei Zentrifugieren zerbrochen (2x)
- Blut vor Präparation geronnen (1x)
- Kein Buffy-Coat nach Zentrifugieren (2x)

gemäß dem Versuchsprotokoll auf die Platte aufzubringen. In einem Fall (2,9%) war ein Anwenderfehler Ursache für eine erfolglose Messung, in 8 Fällen (23,5%) lag ein technischer Fehler vor (siehe Kasten 1).

Kasten 1: Technische Fehler bei der Ficoll-Separation

3.5.1. Zu geringe Ausbeute der Zellseparation

Wie oben beschrieben, war die nicht ausreichende Zell-Isolierung der häufigste Grund, weshalb der EliSpot nicht durchführbar war. Bei 5 Patienten scheiterte die Durchführung des Testes wiederholt an dieser Hürde, bei zwei Patienten sogar in 3 Fällen. Wir verglichen daher neben demographischen Daten auch die Routine-Blutbilder dieser 17 Patienten mit denen der 34 Patienten, bei denen die Zellgewinnung erfolgreich verlaufen war (siehe Tabelle 5). Patienten, bei denen die vollständigen Durchführung des EliSpot an zu geringer Zahl an isolierten PBMC scheiterte, waren häufiger weiblich und hatten im Blutbild signifikant niedrigere absolute Lymphozytenzahlen. Die beiden Gruppen unterschieden sich nicht in Bezug auf Alter, Alter bei Transplantation, Posttransplantationszeit oder die Gesamtleukozytenzahlen. Daten zu der tatsächlich eingesetzten Menge an EDTA-Blut pro Patient sowie zur Frage, wie deutlich die Anzahl von 2×10^6 Zellen/ml verfehlt wurde, lagen nicht vor (siehe Tabelle 5).

Tab. 5: Vergleich zwischen Patienten mit und ohne erfolgreiche Zellseparation

	Patienten mit erfolgreicher Zellseparation und EliSpot-Messung (n=34)	Patienten ohne erfolgreiche Zellseparation (n=17)	p
Demographie			
Alter (Jahre)	13,8 (10,3 – 21,4)	11,8 (9,4 – 16,4)	*0,0016
Weiblich	19 [56%]	15 [88%]	+0,015
Alter (Jahre) bei Transplantation	6,5 (2,2 – 12,2)	5,7 (0,6 – 11,5)	*0,41
Posttransplantzeit	7,6 (5,1 – 10,1)	5,2 (2,5 – 10,8)	*0,21
Blutbild			
Leukozyten gesamt (G/ μ l)	8,0 (6,2 – 9,7)	7,3 (4,7 – 9,1)	*0,23
Lymphozyten gesamt (G/μl)	2,8 (1,6 – 3,6)	1,6 (1,1 – 2,6)	*0,02
Angaben als Median (Interquartilsbereich) bzw. n [Prozent], *Mann-Whitney Test, +Fisher's Exact Test, Signifikanz als $p < 0,05$.			

4. Diskussion

4.1. Studienpopulation

Nach unserem Kenntnisstand sind wir die erste Gruppe, die Ergebnisse einer Untersuchung der spezifischen T-Zell-Immunität gegen EBV an einem Patientenkollektiv mit folgenden Charakteristika präsentieren: Ausschließlich Patienten nach Herztransplantation im Kindesalter, darunter sowohl asymptomatische Patienten als auch Patienten mit Zustand nach PTLD. Mit einer medianen Posttransplantzeit von 7,6 Jahren lag die untersuchte Patientengruppe in dem Zeitfenster, in dem das Risiko, an einer PTLD zu erkranken, besonders hoch ist [2]. Die Geschlechterverteilung war mit 55,9% weiblichen und 44,1% männlichen Studienteilnehmern ausgeglichen. Wie bei Macedo et al. beschrieben sahen auch wir hinsichtlich der Epstein-Barr-Viruslast unterschiedliche Formen der chronischen Infektion repräsentiert: 14 Patienten (41,2%) mit einer Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze von 1000 Kopien/ml, 9 Patienten (26,5%) mit mäßig erhöhter und 11 Patienten (32,4%) mit deutlich erhöhter Viruslast [41]. Es ließen sich 2 Untergruppen identifizieren, die die jeweils gleiche immunsuppressive Therapie erhielten (Ciclosporin + Everolimus, n=15 bzw. Ciclosporin A + MMF, n=7). Die Prävalenz einer PTLD lag in der von uns untersuchten Gruppe mit 26,5% über den in der Literatur angegebenen Werten. Die Inzidenz der PTLD der Zentrumskohorte (DHZB) ist mit 21% vergleichbar mit publizierten Daten [2, 4].

4.2. Ergebnisse der EliSpot-Untersuchung

CD8+ T-Lymphozyten gelten als die Hauptakteure in der Immunkontrolle, sowohl der akuten wie der chronischen EBV-Infektion. Hoshino et al. dokumentierten im Jahre 2011 eine enge Korrelation zwischen der Anzahl EBV-spezifischer CD8+ T-Zellen und fallender EBV-Viruslast in immungesunden Patienten die an einer infektiösen Mononukleose erkrankt waren [42]. Woodberry et al. verglichen anderweitig gesunde Patienten mit infektiöser Mononukleose und solche mit persistierender EBV-Infektion unter anderem hinsichtlich der Anzahl EBV-spezifischer CD8+ T-Zellen. Hier zeigten sich signifikant höhere Zahlen spezifischer T-Zellen in den akut infizierten Patienten [43].

4.2.1. Zusammenhang zwischen EBV-Viruslast und EBV-spezifischen CD8+ T-Lymphozyten

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass CD8+ T-Lymphozyten einen wesentlichen Anteil an der Immunabwehr gegen das Epstein-Barr-Virus haben und dass bei einer aktiven Virusreplikation mit einer Expansion dieser Zellklasse zu rechnen ist. Wir verglichen Patienten mit hoher und niedriger Viruslast und wählten als Grenzwert zunächst einen Wert von 2000 Kopien DNA/ml. In einer weiteren Analyse wählten wir einen Grenzwert von 16000 Kopien DNA/ml, da Bingler et al. für Patienten mit chronischer erhöhter Viruslast über diesen Wert eine 45-prozentige Wahrscheinlichkeit, eine PTLD zu entwickeln, beschrieben hatten [44]. Wir sahen in beiden Analysen eine stärkere Immunantwort in der Gruppe mit höherer Viruslast, die Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant. Wurden die Patienten mit einer PTLD in der Anamnese aus der Untersuchung ausgeschlossen, zeigten sich eine signifikant stärkere Immunantwort gegen lytische Antigene bei Patienten mit hohen Viruslasten für beide Grenzwerte. Dieser Befund stützt die These einer eingeschränkten EBV-spezifischen Immunabwehr bei Patienten mit PTLD. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen von Macedo et al. bei 44 Patienten nach Herz- oder Herz-Lungentransplantation im Kindesalter. Hier wurden prospektive EliSpot-Messungen an bis dato asymptomatischen Patienten durchgeführt, es zeigten sich signifikant stärkere Immunantworten im EliSpot bei Patienten mit hoher Viruslast.

In unserer Analyse sahen wir keinen linearen Zusammenhang zwischen Viruslast und Immunantwort im EliSpot, weder auf latente noch lytische Antigene. Im Vergleich dazu fanden Macedo et al. eine positive Korrelation zwischen Epstein-Barr-Viruslast und EBV-spezifischen T-Zellen gegen lytische Antigene lediglich bei Patienten mit hoher Viruslast [41].

Darüber hinaus fällt auf, dass einige Patienten scheinbar paradox hohe Zahlen spezifischer T-Zellen trotz niedriger Viruslast aufweisen. Dies ist ein Befund, der auch in anderen Publikationen zu finden ist (vergleiche Macedo et al. 2011 [Macedo 41]). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass bei diesen Patienten eine Phase lytischer Virusvermehrung erst kurze Zeit zurückliegt und die Normalisierung der Zahlen an spezifischen T-Zellen noch aussteht. Hoshino et al. beschrieben bei sonst gesunden Patienten mit akuter Mononukleose eine doppelt so hohe Halbwertszeit der EBV-

spezifischen T-Zellen wie der Viruslast, zumindest in der Phase der akuten Infektion [42].

Zusammenfassend lässt sich anhand unserer Daten zeigen, dass bei Patienten mit hoher Viruslast mit einer stärkeren spezifischen CD8+ Immunreaktion gegen Epstein-Barr-Virusantigene zu rechnen ist. Diese Unterschiede sind jedoch nur signifikant bei bislang asymptomatischen Patienten, was den Schluss nahelegt, dass die normale Immunabwehr gegen eine lytische EBV-Replikation bei Patienten mit PTLD in der Anamnese gestört ist.

4.2.2. Einflussfaktor PTLD

Wir verglichen Patienten mit einer PTLD in der Anamnese mit asymptomatischen Patienten und sahen bei Patienten mit Z.n. PTLD zunächst ein deutlich stärkeres Ansprechen auf lytische Epstein-Barr-Virusantigene. Dies war zu erwarten, da diese Gruppe signifikant höhere Viruslasten aufwies. Verglichen wir dann aber nur Patienten mit hoher Viruslast mit und ohne PTLD in der Anamnese, sahen wir eine deutlich verminderte Immunantwort bei Patienten mit Z.n. PTLD. Dieser Befund war jedoch nicht signifikant. Ein deutlicher Trend hin zu einer reduzierten Immunantwort bei Patienten mit Z.n. PTLD zeigte sich nur, wenn ein Ausreißer mit besonders hoher Viruslast und einer hohen Zahl spezifischer T-Zellen aus der Analyse ausgeschlossen wurde. Diese Befunde sind rein deskriptiven Charakters, ermuntern uns jedoch, die Untersuchung mittels EliSpot in diesem Patientenkollektiv fortzusetzen, um durch eine größere Zahl an Probanden statistisch validere Ergebnisse zu erhalten.

Im Vergleich dazu zeigte auch die Untersuchung von Smets et al. bei Patienten nach Lebertransplantation im Kindesalter verminderte EBV-spezifische T-Zellen bei gleichzeitig hoher Viruslast bei solchen Patienten, die im Verlauf eine PTLD entwickelten. Bei Patienten mit EBV-Primärinfektion nach Lebertransplantation waren die Untersucher in der Lage, anhand der spezifischen Immunantwort zum Zeitpunkt der höchsten Viruslast im Rahmen der akuten Infektion, einen Quotienten zu entwickeln, anhand dessen sich das Risiko, eine PTLD zu entwickeln abschätzen lässt. Patienten mit niedriger Immunantwort im Rahmen der Primärinfektion hatten demnach ein höheres Risiko, im Verlauf an PTLD zu erkranken [40].

Zusammenfassend lässt sich postulieren, dass es Patienten gibt, die eine chronische Epstein-Barr-Virusinfektion trotz immunsuppressiver Therapie gut unter

immunologischer Kontrolle haben, und solche, deren Immunsystem die Infektion nicht ausreichend kontrolliert. In allen diesen Patienten wird eine steigende Viruslast mit einem Anstieg der spezifischen T-Zellen gegen lytische EBV-Antigene beantwortet. Die vorliegenden Daten lassen vermuten, dass Patienten mit PTLD in der Anamnese (oder solche, die im Verlauf einer Beobachtung eine PTLD entwickeln) eine eingeschränkte EBV-spezifische Immunität aufweisen, die sich in einer inadäquaten Expansion der EBV-spezifischen T-Zellen im Falle ansteigender Viruslast äußert. Prospektiv angelegte Studien mit größeren Patientenzahlen sind notwendig, um hier Grenzwerte zu definieren, ab denen mit einem höheren Risiko für die Entwicklung einer PTLD zu rechnen ist. So identifizierte Patienten könnten von einer dauerhaften Reduktion oder gänzlichen Umstellung der immunsuppressiven Therapie profitieren.

4.2.3. Einflussfaktor Immunsuppression

Wie bereits erwähnt wird der Einfluss immunsuppressiver Medikamente auf das Risiko, eine PTLD zu entwickeln, kontrovers diskutiert. In unserer Studienpopulation konnten wir zwei Gruppen von Patienten mit gleicher immunsuppressiver Behandlung identifizieren, die groß genug waren, um eine statistische Auswertung durchzuführen. Patienten, die zum Untersuchungszeitpunkt mit einer Kombination aus Ciclosporin A und Mycophenolat Mofetil behandelt wurden, hatten signifikant niedrige Epstein-Barr-Viruslasten als solche, die Ciclosporin A und Everolimus einnahmen. Kein Patient in der Gruppe der mit MMF Behandelten hatte eine Viruslast über 2000 Kopien DNA/ml. Die gemessenen Cyclosporin A-Talspiegel waren nicht verschieden. Dies Ergebnis steht in Einklang mit bereits publizierten Daten dieser Arbeitsgruppe, wonach auch unter prospektiver Beobachtung, Patienten mit MMF als sekundärem Immunsuppressivum niedrigere EBV-Viruslasten aufwiesen [10]. Birkeland et al. konnten zeigen, dass unter der Therapie mit MMF das Risiko für eine PTLD signifikant reduziert ist [16]. Wie bei deutlich niedrigerer Viruslast zu erwarten ist, zeigten die Patienten, die mit MMF behandelt wurden, eine geringere Immunantwort auf lytische Antigene.

Zusammenfassend unterstützen unsere Ergebnisse die Vermutung, dass der Gebrauch von MMF sich positiv auf die EBV-spezifische Immunität und damit das Risiko, an einer PTLD zu erkranken, auswirkt. Die Mechanismen, durch die dieses erreicht wird, sind weiterhin ungeklärt und bedürfen weiterer Untersuchungen. Ob es sich hier um eine bessere T-Zell-Kontrolle der Virusreplikation handelt, kann mit unseren Daten nicht beantwortet werden, da es bei diesen Patienten scheinbar zu gar

keiner ausgeprägten Virusreplikation kommt. Eine weitere mögliche Erklärung für die niedrigeren Viruslasten in diesen Patienten ist die direkte Hemmung, die MMF als Antimetabolit auch auf die B-Lymphozyten, das Reservoir der EBV-Infektion, ausübt. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Inzidenz der PTLD in unserem Zentrum deutlich rückläufig ist, seit gemäß zentrumseigener Protokolle bei Patienten mit chronisch hohen Viruslasten unter einer Therapie mit Cyclosporin A + Everolimus eine Umstellung auf eine Kombinationstherapie mit MMF erfolgt.

4.2.4. Serielle Messungen bei Patienten mit und ohne PTLD in der Anamnese

Die Ergebnisse der seriellen Bestimmungen von Viruslast und Immunantwort stimmen mit Beobachtungen anderer Untersucher weitestgehend überein. Wir sahen bei 6/9 Patienten eine deutliche Zunahme der Immunantwort auf lytische Antigene im Falle eines Anstieges der Viruslast. Bei den Patienten #1 und #5 (Abb. 15 bzw. 19) ist außerdem zu beobachten, wie im Anschluss an einen Zustand mit hoher Virusreplikation ein erneuter Abfall der detektierbaren EBV-spezifischen T-Lymphozyten erfolgt. Dies entspricht den Befunden bei immungesunden Patienten mit infektiöser Mononukleose sowie denen bei asymptomatischen Kindern nach Organtransplantation [42, 40, 41]. Vor dem Hintergrund der Hypothese, dass bei Patienten mit PTLD in der Anamnese eine gestörte EBV-Immunität vorliegen könnte, ist es zunächst verwunderlich, dass dieser Anstieg auch bei 2/3 der mehrfach gemessenen PTLD-Patienten zu finden ist. Smets et al. konnten zeigen, dass zum Zeitpunkt der Diagnosestellung einer PTLD ein adäquater Anstieg der EBV-spezifischen T-Zellen bei hoher Viruslast ausgeblieben war. Dieser erfolgte dann erst nach Reduktion der Immunsuppression [40]. Es wäre also denkbar, dass die Immunabwehr gegen EBV in den hier untersuchten Patienten nach Überleben der PTLD wieder eine normale Funktion zeigt.

4.3. Technische Umsetzbarkeit von EliSpot-Untersuchungen bei Kindern

Der häufigste Grund für eine nicht erfolgreiche Durchführung des EliSpots war, dass nicht genügend PBMC (Lymphozyten und Monozyten) isoliert werden konnten. Die Anzahl an PBMC, die mittels Dichtegradientenseparation von einem Individuum gewonnen werden können, hängt von folgenden Faktoren ab: 1. Gesamtlymphozytenzahl des Patienten, 2. Menge an Ausgangsmaterial (Blut), 3. Effektivität der Separation.

4.3.1. Notwendige Lymphozytenzahl zur Durchführung des EliSpot

Die Patienten, bei denen nicht genügend PBMC isoliert werden konnten, um den Versuch zu beginnen, hatten signifikant niedrigere Gesamtlymphozytenzahlen als die erfolgreich Gemessenen. Da sich die Bereiche, in denen sich die Lymphozytenzahlen der beiden Gruppen befanden, überschneiden, lässt sich kein klarer Grenzwert ableiten, unter dem eine erfolgreiche Separation als aussichtslos anzusehen ist. Wir empfehlen angesichts unserer Erfahrung jedoch, bei Patienten, bei denen die Gesamtlymphozytenzahl unter 2000/ml liegt, statt 4-8ml (wie für diese Studie erfolgt) tendenziell 10-15ml EDTA-Blut zu gewinnen, sofern dies ohne zusätzliche Belastung des Patienten möglich ist.

4.3.2. Notwendige Menge Blut für den EliSpot

Für unsere Studie strebten wir an, 4-8ml Blut pro Patient zu gewinnen. Dass diese Menge unter bestimmten Bedingungen nicht ausreichend sein kann, wurde bereits diskutiert. Bei einzelnen, sehr jungen Probanden war es zu unterschiedlichen Zeitpunkten nicht möglich, die anvisierte Menge von 4ml Blut zu gewinnen. Von wiederholten Punktionen zu alleinigen Studienzwecken wurde abgesehen. Die tatsächlichen Mengen an gewonnenem Blut wurden nicht regelmäßig dokumentiert, so dass eine Mindestmenge an notwendigem Untersuchungsmaterial für Patienten mit Lymphozytenzahlen oberhalb von 2000 Zellen/ml nicht angegeben werden kann. Wir denken jedoch, dass die vielversprechenden Ergebnisse dieser und anderer Studien mit dieser Methode, für zukünftige, prospektive Untersuchungen auch die mehrfache Punktion kleinerer Probanden rechtfertigen, um zumindest eine Menge von 4-8ml zu erreichen.

4.3.3. Effektivität der Ficoll-Separation

Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, eine Ficoll-Separation unter Zuhilfenahme kommerziell erhältlicher Blutentnahmeröhrchen durchzuführen, die bereits mit Ficoll und einem Separationsgel befüllt sind. Alternativ können die gewonnenen Blutproben manuell mit Ficoll überschichtet werden. Wir sahen Misserfolge durch Platzen der von uns eingesetzten Glasröhrchen sowie Fehlfunktionen des eingesetzten Gels (siehe Kasten 1). Im Juli des Jahres 2014 veröffentlichte die Firma Becton Dickinson einen Rückruf für 9 Chargen ihrer Zellseparier Röhrchen aufgrund von niedriger Zellausbeute. Die Möglichkeit, diese Fehlerquellen durch eigenhändiges Präparieren in

Kunststoffröhrchen zu eliminieren, und damit auch kostengünstiger zu arbeiten, muss gegen den zusätzlichen Arbeitsaufwand abgewogen werden.

4.4. Limitationen

4.4.1. Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelte es sich um eine monozentrische Querschnittstudie. Sie ist damit nicht prospektiv angelegt und es können aus den Messergebnissen keine Rückschlüsse auf das Risiko einzelner Patienten, an einer PTLD zu erkranken, gezogen werden. Ob eine verminderte Anzahl an spezifischen T-Lymphozyten auf lytische Antigene mit einem größeren Risiko einhergeht, muss in einer prospektiv, optimalerweise multizentrisch angelegten Studie untersucht werden. Auch die relativ kleine Größe der Studienpopulation schränkt die Wahrscheinlichkeit, signifikante Unterschiede zu detektieren ein. Für eine bessere Aussagekraft ergibt sich auch in dieser Hinsicht der Bedarf an einer multizentrischen Durchführung weiterer Studien zu diesem Thema.

4.4.2. Methode

Der EliSpot ist eine anerkannte Messmethode zur Bestimmung der spezifischen zellulären Immunreaktion auf ein bestimmtes Antigen. Erfasst werden jedoch nur die Zellen, die zum Zeitpunkt der Untersuchung auch in der Lage waren, ihre Effektorstoffe (wie z.B. TNF- α) auszuschütten. Die Untersuchung von Macedo et al. lieferte Hinweise, dass sich Patienten mit hohen Viruslasten von solchen mit niedrigeren weniger in der Anzahl, als mehr in der Aktivierbarkeit (gemessen am Vorhandensein bestimmter Oberflächenmarker in der Durchflusszytometrie) unterscheiden [41]. In zukünftige Studien zu diesem Thema sollten daher auch die Durchflusszytometrie Anwendung finden, um die Physiologie der EBV-spezifischen Immunität in Patienten nach Organtransplantation besser zu verstehen.

Eine weitere Einschränkung des EliSpot in seiner hier beschriebenen Form ist, dass er keine Aussage über die Anzahl oder Aktivierbarkeit EBV-spezifischer CD4+ T-Lymphozyten erlaubt. Um diese selektiv im EliSpot darstellen zu können, müssten die durch Ficoll-Separation gewonnenen Lymphozyten weiter separiert werden. Eine Möglichkeit hierzu bietet die Magnetperlenseparation (*Magnetic Bead Separation*). Hierbei können mittels antikörperbeladener Magnetperlen z.B. selektiv CD8+ Zellen mithilfe eines Magneten in einem Reagenzglas zurückgehalten und nur die CD4+ Zellen

dekantiert werden [45]. Wir konnten bereits einige Erfahrungen mit dieser Methode sammeln und hoffen, in Zukunft auch zum besseren Verständnis der Interaktion zwischen CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten in der Pathogenese der PTLD beitragen zu können.

5. Zusammenfassung

Wir untersuchten Patienten mit Zustand nach pädiatrischer Herztransplantation hinsichtlich ihrer Epstein-Barr-Virus-spezifischen T-Zell-Immunität im EliSpot-Assay. Darüber hinaus wurde die aktuelle EBV-Viruslast mittels rtPCR bestimmt und weitere Daten aus den Patientenakten erhoben.

Es zeigte sich bei Patienten mit hoher EBV-Viruslast eine nicht signifikant stärkere Immunantwort auf lytische Antigene (Grenzwert für hohe Viruslast 2000 Kopien/ml: $p=0,06$; Grenzwert 16000 Kopien/ml: $p=0,16$). Wurden nur Patienten ohne PTLD in der Anamnese analysiert, zeigte sich eine signifikant stärkere Immunantwort auf lytische Antigene bei Patienten mit hoher Viruslast (Grenzwert 16000 Kopien/ml: $p=0,03$). Patienten mit PTLD in der Anamnese hatten höhere Viruslasten ($p=0,001$) jedoch fehlte die bei asymptomatischen Patienten beschriebene stärkere Immunantwort auf lytische Antigene. Wurden nur Patienten mit Viruslast > 16000 Kopien/ml betrachtet, zeigten Patienten mit Z.n. PTLD eine schwächere Immunantwort auf lytische Antigene ($p=0,18$).

In seriellen Messungen sahen wir bei 6/9 Patienten ein deutliches Ansteigen der lytischen Immunantwort im Falle eines Ansteigens der Viruslast. Bei einem Patienten mit PTLD in der Anamnese war dieser Zusammenhang umgekehrt.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass bei Patienten mit PTLD in der Anamnese eine gestörte EBV-spezifische T-Zell-Immunität - vor allem gegen lytische Antigene - vorliegen könnte. Hieraus ergibt sich die weitere Fragestellung, ob mittels EBV-EliSpot eine Vorhersage möglich ist, welche Patienten ein größeres Risiko haben, eine PTLD zu entwickeln. Dies muss in prospektiven und optimalerweise multizentrisch angelegten Studien gezeigt werden.

6. Literaturverzeichnis

1 Canter CE, Shaddy RE, Bernstein D, et al. Indications for heart transplantation in pediatric heart disease: a scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young; the Councils on Clinical Cardiology, Cardiovascular Nursing, and Cardiovascular Surgery and Anesthesia; and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. *Circulation* 2007; 115: 658-76

2 Dipchand AI, Edwards LB, Kucheryavaya AY, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Seventeenth Official Pediatric Heart Transplantation Report – 2014; Focus Theme: Retransplantation. *J Heart Lung Transplant* 2014; 33: 985-995

3 Dipchand AI, Kirk A, Edwards LB, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Sixteenth Official Pediatric Heart Transplantation Report – 2013; Focus Theme: Age. *J Heart Lung Transplant* 2013; 32: 379-388

4 Jagadeesh D, Wood BA, Draper J, Evens AM. Post Transplant Lymphoproliferative Disorders: Risk, Classification, and Therapeutic Recommendations. *Curr Treat Options Oncol* 2012; 13: 122-136

5 Taylor AL, Marcus R, Bradley JA. Post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) after solid organ transplantation. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 56(1): 155-167

6 Mynarek M, Schober T, Behrends U, Maecker-Kolhoff B. Posttransplant Lymphoproliferative Disease after Pediatric Solid Organ Transplantation. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 814973 doi: 10.1155/2013/814973

- 7 Manlhiot C, Pollock-BarZiv AM, Holmes C, et al. Post-transplant lymphoproliferative disorder in pediatric heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2010; 29: 648-57
- 8 Webber SA, Naftel DC, Fricker FJ, et al. Lymphoproliferative disorders after pediatric heart transplantation: a multi-institutional study. *Lancet* 2006; 367: 233-39
- 9 Green M, Michaels MG. Epstein-Barr Virus Infection and Posttransplant Lymphoproliferative disorder. *Ame J Transplant* 2013; 13: 41-54
- 10 Schubert S, Renner C, Hammer M, et al. Relationship of Immunosuppression to Epstein-Barr Viral Load and Lymphoproliferative Disease in Pediatric Heart Transplant Patients. *J Heart Lung Transplant* 2008; 27: 100-5
- 11 Hoegh-Petersen M, Goodyear D, Geddes MN, et al. High incidence of post transplant lymphoproliferative disorder after antithymocyte globulin-based conditioning and ineffective prediction by day 28 EBV-specific T lymphocyte counts. *Bone Marrow Transpl* 2011; 46: 1104-1112
- 12 Olaitan OK, Zimmermann JA, Shields WP, et al. Long-term outcome of intensive initial immunosuppression protocol in pediatric deceased donor renal transplantation. *Pediatr Transplant* 2010; 14: 87-92
- 13 Lu BR, Park KT, Hurwitz M, Cox KL, Berquist WE. Impact of Immunosuppression on the Development of Epstein-Barr Virus (EBV) Viremia After Pediatric Liver Transplantation. *Transplant Proc* 2013; 45: 301-304
- 14 Opelz G, Döhler B. Lymphomas after Solid Organ Transplantation: A Collaborative Transplant Study Report. *Am J Transplant* 2003; 4: 222-230
- 15 Dayton JD, Richmond Marc E, Weintraub RG, et al. Role of immunosuppression regimen in post-transplant lymphoproliferative disorder in pediatric heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant* 2011; 30: 420-5

16 Birkeland SA, Hamilton-Dutoit S. Is posttransplant proliferative disorder (PTLD) caused by any specific immunosuppressive drug or by the transplantation per se? *Transplantation* 2003; 76: 945-988

17 Valantine H. Is There a Role for Proliferation Signal/mTOR Inhibitors in the Prevention and Treatment of De Novo Malignancies After Heart Transplantation? Lessons Learned From Renal Transplantation and Oncology. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 2007; 26: 557-564

18 Bakker NA, Van Imhoff GW, Verschuuren EAM, et al. HLA Antigens and Post Renal Transplant Lymphoproliferative Disease: HLA-B Matching Is Critical. *Transplantation* 2005; 80: 595-599

19 Subklewe M, Marquis R, Choquet S, et al. Association of Human Leukocyte Antigen Haplotypes with Postransplant Lymphoproliferative Disease after Solid Organ Transplantation. *Transplantation* 2006; 82: 1093-1100

20 Ohta H, Fukushima N, Ozono K. Pediatric post-transplant lymphoproliferative disorder after cardiac transplantation. *Int J Hematol* 2009; 90: 127-136

21 Schubert S, Abdul-Khaliq H, Lehmkuhl HB, et al. Diagnosis and treatment of post-transplantation lymphoproliferative disorder in pediatric heart transplant patients. *Pediatr Transplant* 2009; 13: 54-62

22 Zimmermann H, Trappe RU. EBV and posttransplantation lymphoproliferative disease: what to do? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013; 1: 95-102

23 Haque T, Wilkie GM, Jones MM, et al. Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood* 2007; 110:1123-1131

- 24 Kamdar KY, Rooney CM, Heslop HE. Post-transplant lymphoproliferative disease following liver transplantation. *Curr Opin in Organ Transplant* 2011; 16: 274-280
- 25 Rickinson AB, Kieff E. Epstein–Barr virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. *Field’s Virology*. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven 1996: 2397–446
- 26 Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt’s lymphoma. *Lancet*.1964; 8: 702–703
- 27 Burkitt D. A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg* 1958; 46: 218-23
- 28 Yang J, Lemas VM, Flinn IW, Krone C, Ambinder RF. Application of the ELISPOT assay to the characterization of CD8+ responses to Epstein-Barr virus antigens. *Blood* 2000; 95: 241-248
- 29 Vetsika EK, Callan M. Infectious mononucleosis and Epstein-Barr virus. *Expert Rev Mol Med* 2004; 6: 1-16
- 30 Auwaerter PG. Recent advances in the understanding of infectious mononucleosis: are prospects improved for treatment or control? *Expert Rev Anti-Infect Ther* 2006; 4: 1039-1049
- 31 Rensing ME, Horst D, Griffin BD, et al. Epstein-Barr virus evasion of CD8+ and CD4+ T cell immunity via concerted efforts of multiple gene products. *Semin Cancer Biol* 2008; 18: 397-408
- 32 Lieberman PM. Epstein-Barr Virus Turns 50. *Science* 2014; 343: 1323-25
- 33 Thorey-Lawson DA, Allday MJ. The curious case of the tumor virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6: 913-924

- 34 Raab-Traub N. Novel mechanisms of EBV-induced oncogenesis. *Curr Opin Virol* 2012; 2: 453-458
- 35 Vakiani E, Basso K, Klein U, et al. Genetic and phenotypic analysis of B-cell post-transplant lymphoproliferative disorders provides insights into disease biology. *Hematol Oncol* 2008; 26: 199-211
- 36 Kalyuzhny AE. Chemistry and Biology of the ELISPOT Assay. In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 302: *Handbook of ELISPOT: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press Inc. 2005: 15-31
- 37 Zaritskaya L, Shurin MR, Sayers TJ, Malyguine AM. New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity. *Expert Rev Vaccines* 2010; 9: 601-616
- 38 Kim GG, Donnenberg VS, Donnenberg AD, Gooding W, Whiteside TL. A novel multiparametric flow cytometry-based cytotoxicity assay simultaneously immunophenotypes effector cells: Comparisons to a 4 h ⁵¹Cr-release assay. *J Immunol Methods* 2007; 325: 51–66
- 39 Helms T, Boehm BO, Assad RJ, Trezza RP, Lehmann PV, Tary-Lehmann M. Direct Visualization of Cytokine-Producing Recall Antigen-Specific CD4 Memory T Cells in Healthy Individuals and HIV Patients. *J Immunol* 2000; 167: 3723-3732
- 40 Smets F, Latinne E, Bazin H, et al. Ratio between epstein-barr viral load and anti-epstein-barr virus specific t-cell response as a predictive marker of posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation* 2002; 73: 1603-1610
- 41 Macedo C, Webber SA, Donnenberg AD, et al. EBV-Specific CD8+ T Cells from Asymptomatic Pediatric Thoracic Transplant Patients Carrying Chronic High EBV Loads Display Contrasting Features: Activated Phenotype and Exhausted Function. *J Immunol* 2011; 186: 5854-5862
- 42 Hoshino Y, Nishikawa K, Ito Y, Kazushima K, Kimura H. Kinetics of Epstein-Barr virus load and virus-specific CD8+ T cells in acute infectious mononucleosis. *J Clin Virol* 2011; 50: 244-246

43 Woodberry T, Suscovich TJ, Henry LM, et al. Differential Targeting and Shifts in Immunodominance of Epstein-Barr Virus-Specific CD8 and CD 4 T Cell Responses during Acute and Persistent Infection. *J Infect Dis* 2005; 192: 1512-24

44 Bingler MA, Feingold B, Miller SA, et al. Chronic high Epstein-Barr viral load state and risk for late-onset posttransplant lymphoproliferative disease/lymphoma in children. *Am J Transplant* 2008; 8: 442–445

45 Plouffe BD, Murthy SK, Lewis LH. Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: a review. *Rep Prog Phys* 2015; 78: 016601

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Simon Hingler, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Spezifische T-Zell-Immunität gegen Epstein-Barr-Virusantigene in Patienten nach Herztransplantation im Kindesalter“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Felix Berger und Herrn PD Dr. med. Stephan Schubert für die Überlassung des Promotionsthemas, die hervorragende Betreuung und die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau PD Dr. med. Katharina Schmitt und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Schmitt bedanken, in deren Labor der Großteil der Versuche zu dieser Arbeit stattfanden.

Ich bedanke mich auch bei den Patienten und ihren Eltern, die sich bereit erklärten, an dieser Studie teil zu nehmen.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, die mich stets unterstützen und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.