

Aus der Universitätsklinik für Kinder– und Jugendmedizin

Tübingen

Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

**Regeneration Adenovirus–spezifischer T-Zellen nach
pädiatrischer Stammzelltransplantation**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der medizinischen Fakultät

der Eberhard Karls Universität

Tübingen

vorgelegt von

Julia Lücke

aus Tübingen 2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Niethammer

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Jahn

Für meine Eltern und all diejenigen, die in dieser Zeit mit ihrer Freundschaft
und vielen offenen Ohren für mich da waren.

„Unordnung ist, wenn nichts am richtigen Ort ist.
Ordnung ist, wenn am richtigen Ort nichts ist.“

Berthold Brecht (1898-1956)

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Historisches	1
1.2	Adenoviren	2
1.2.1	Biologie der Adenoviren	2
1.2.2	T–Zell-Immunantwort	3
1.2.3	Der Infektionszyklus der Adenoviren	5
1.2.4	Inzidenz einer Adenovirusinfektion	6
1.2.5	Klinische Manifestation des Adenovirus	7
1.2.6	Adenovirusinfektion nach Stammzelltransplantation	7
1.2.7	Nachweis von Adenoviren	9
1.2.8	Therapie	10
1.2.9	Mortalität einer Adenovirusinfektion nach Stammzelltransplantation	11
1.3	Immunrekonstitution nach Stammzelltransplantation	12
1.4	Fragestellung	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Patienten und Probanden	17
2.2	Material	22
2.2.1	Reagenzienverzeichnis	22
2.2.2	Geräte	24
2.2.3	Hintergrund Durchflußzytometrie	25
2.3	Methoden	28
2.3.1	Prinzip	28
2.3.2	Antigenspezifische Stimulation	28
2.3.3	Zytokin-Sekretionsassay	29
2.3.4	Prinzip der intrazellulären Zytokinfärbung	31
2.3.5	Stimulation	31
2.3.6	Intrazelluläre Zytokinfärbung	32

2.3.7 Messung und Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung	33
2.3.8 Berechnung von Signifikanz, Mittelwert und Standardabweichung.....	34
3 Ergebnisse	35
3.1 Adenovirus-spezifische T-Zellen bei gesunden Spendern	35
3.2 Adenovirus-spezifische T-Zellen bei Patienten vor Transplantation	36
3.3 Vergleich der beiden Messmethoden: Intrazelluläre Zytokinfärbung mit dem Zytokin-Sekretionsassay.....	38
3.4 Regeneration Adenovirus-spezifischer T-Zellen bei allen Patienten nach Stammzelltransplantation	43
3.5 Regeneration der Adenovirus-spezifischen CD3+ T-Zellen bei Patienten nach Stammzelltransplantation im Vergleich zu gesunden Spendern.....	46
3.6 Adenovirus-spezifische T-Zell-Regeneration nach haploidentischer, Geschwister-oder Fremdspendertransplantation.....	49
3.7 Vergleich von Patientengruppen, die mit unselektioniertem Knochenmark, selektionierten Stammzellen aus Leukoapheresat und zusätzlichen T-Zellgaben transplantiert wurden	53
4 Diskussion	57
4.1 Methodenkritik.....	57
4.1.1 Die Bearbeitungs- und Nachweisverfahren.....	57
4.1.2 Zytokin-Sekretionsassay	57
4.1.3 Die intrazelluläre Zytokinfärbung.....	58
4.1.4 Nachweis Antigen-spezifischer Zellen.....	58
4.2 Gesunde Spender	60
4.3 Patienten vor Transplantation	60
4.4 Vergleich der beiden Messmethoden: Intrazelluläre Zytokinfärbung und Zytokin-Sekretionsassay	61
4.5 Regeneration von 4 Patienten nach Stammzelltransplantation	62
4.6 Regeneration Adenovirus-spezifischer T-Zellen bei Patienten nach Stammzelltransplantation	62

4.7	Regeneration der Adenovirus-spezifischen T-Zellen von Patienten nach Stammzelltransplantation im Vergleich zu gesunden Spendern.....	64
4.8	Vergleich von Patienten mit haploidentischen Familienspendern, HLA-identischen Geschwisterspendern und HLA-identischen Fremdspendern.....	65
4.9	Vom Transplantat abhängige Untergruppe: unselektioniertes Knochenmark, selektionierte Stammzellen aus Leukoapheresat und zusätzliche T-Zellgaben.....	67
4.10	Alle Meßdaten der Adenovirus-spezifischen CD3+ -/ CD8+-und CD4+-T-Zellen.....	67
4.11	Spezifität der Messung von Adenovirus-spezifischen T- Zellen	68
4.12	Individuelle Unterschiede in der Regeneration der spezifischen T-Zellen	70
4.13	Ausblick in Ursachen der Adenovirusinfektion Forschung und Therapie	71
5	Zusammenfassung	73
6	Anhang.....	74
	Tabellenverzeichnis	74
	Abbildungsverzeichnis	74
	Literaturverzeichnis.....	76
	Danksagung.....	84
	CURRICULUM VITAE	85

1 Einleitung

1.1 Historisches

1590 schafften die Brillenschleifer Hans und Zacharias Janssen die Voraussetzung für den entscheidenden Fortschritt in der Geschichte der Zellforschung: Die Herstellung des ersten Mikroskopes, die in den folgenden Jahrhunderten von Huygens, Amivi, Fraunhofer, Oberhäuser, Hartnack, Zeiss und Abbé noch deutlich verbessert und weiterentwickelt wurde. Von nun an war es möglich die kleinste Einheit eines jeden Lebens, die Zelle, für das menschliche Auge sichtbar zu machen.

In den letzten 20 Jahren wurde an zahlreichen Tests geforscht um die Zellproliferation, die Differenzierung der Zelle und die Zellphysiologie genauer analysieren zu können. Zu den herausragenden Verfahren zählen zahlreiche Assays zur Färbung, Bearbeitung und Erfassung Antigen-spezifischer T-Zellen und zu deren Detektion die Durchflußzytometrie. Beide Verfahren sind Hauptbestandteil meiner Arbeit.

Seit seiner Erstbeschreibung in den frühen 50er Jahren [1] ist die Adenovirusinfektion immer mehr Gegenstand intensiverer Forschung geworden. In den 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurde über die Komplikation der Adenovirusinfektion nach Stammzelltransplantation publiziert [34, 35, 36]. Sowohl im Bereich der Virusstruktur und Therapie wurde viel Forschung betrieben. In den Jahren 1997 bis 1999 auch über die mögliche Nutzung von Adenoviren als Vektoren [3, 43] und der damit verbundenen neuen Therapiemöglichkeiten. Trotzdem sind immer noch zahlreiche Mechanismen innerhalb der infizierten Zelle unverstanden, vor allem bezüglich der Interaktion von Virusgenprodukten mit den Zellbestandteilen und die Immunantwort der Wirtszelle [3].

Bei pädiatrischen Patienten nimmt die Inzidenz der Adenovirusinfektion nach Stammzelltransplantation und somit auch ihre Bedeutung in den letzten Jahren mehr und mehr zu [4, 12].

1.2 Adenoviren

1.2.1 Biologie der Adenoviren

Adenoviren besitzen ein ikosaederförmiges Kapsid bestehend aus 3 Hauptproteinen und zahlreichen anderen Proteinen [2,3].

Das Genom humaner Adenoviren besteht aus 36 000 Basenpaaren [3]. Es ist linear, eine Doppelstrang-DNA mit terminalem Protein, das kovalent an das 5'-Ende gebunden ist und eine kodierte Protease enthält. Beim Menschen gibt es 51 verschiedene Serotypen, die in 6 Untergruppen von A bis F unterteilt sind [2]. Der Hauptrezeptor der humanen Untergruppe C wurde als identisch mit dem Coxsackie B Virus nachgewiesen. Es handelt sich um ein Plasmamembranprotein, zu der Familie der Immunglobuline gehörend, das extrazelluläre, transmembrane und zytoplasmatische Domänen enthält. Rezeptorerkennung, die durch das Austauschen durch Faserköpfe von anderen Untergruppen verändert werden kann, könnte einer der Schlüsselfaktoren sein, die in den Zelltropismus involviert sind. Bei den häufigsten Serotypen handelt es sich, Artikeln zu diesem Thema zufolge [6], um die Ziffern 1, 2, 5, 7 und 35.

Da Adenoviren ihr Genom zum Nukleus transportieren und dort eine wirkungsvolle Replikation durchführen sind sie Hauptkandidaten für die Expression und Übertragung therapeutischer Gene [43].

Nach einer Infektion kann der Virus latent im lymphatischen Gewebe [2] bestehen bleiben. Adenovirusinfektionen sind endemisch im Kindes- und Jugendalter. Eine schwere Adenovirusinfektion ist, wie weiter unten noch näher erläutert, eine Erkrankung, die vor allem für immungeschwächte Patienten lebensbedrohliche Komplikationen beinhalten kann.

Interessanterweise gibt es serologische und genetische Unterschiede in den Prototypen des Adenovirus beim Vergleich der isolierten Adenoviridae, die von immunkompetenten Patienten gewonnen wurden, mit denen von HIV positiven Patienten [44].

1.2.2 T-Zell-Immunantwort

Nach ihrer Entwicklung im Thymus, ihrer Reise ins Blut, zu den peripheren lymphatischen Organen und wieder zurück ins Blut, werden die naiven T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung angeregt, sie entwickeln sich also zu bewaffneten T-Effektorzellen.

Entscheidend bei dieser adaptiven Immunantwort ist die Aktivierung der T-Zellen durch professionelle antigenpräsentierende Zellen. Die wichtigsten professionellen antigenpräsentierenden Zellen sind hochspezialisierte dendritische Zellen, B-Zellen sowie Makrophagen. Die Stimulation zur Differenzierung und Proliferation erfolgt zum einen durch die Bindung der antigenspezifischen Rezeptoren und der Co-Rezeptoren an einem Peptid, dem MHC-Komplex, und zum anderen durch ein costimulatorische Signale. Bei diesen Signalen zum Wachstum naiver T-Zellen handelt es sich zum Beispiel um das homodimere Molekül aus der Superfamilie der Immunglobuline mit dem Namen B7, das ausschließlich auf der Oberfläche von Zellen zu finden ist, die das T-Zell Wachstum anregen und dessen Rezeptor das CD28-Molekül auf der T-Zelle darstellt. Antikörper gegen B7 verhindern die Bindung an CD28 und damit die T-Zell-Antwort. CD28 ist ein disulfidgebundenes Homodimer, in dem jede Kette eine Domäne hat, die einer Immunglobulin-V-Domäne ähnelt.

Die Vorgänge der Proliferation und Differenzierung sind von der Produktion des T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2 abhängig und gesteuert.

Nach der Aktivierung der T-Zelle wird CTLA-4 exprimiert - ein zusätzlicher Rezeptor, der in seiner Sequenz dem CD28-Molekül sehr ähnlich ist.

Bei fehlender Costimulation besteht nach Bindung des Antigens an den T-Zell-Rezeptor das Risiko einer Anergie, d.h. die Zelle reagiert nicht mehr auf Aktivierung durch professionelle antigenpräsentierende Zellstimulation, es findet folglich keine Produktion von IL-2 statt und die Zelle differenziert nicht zu einer bewaffneten T-Effektorzelle.

Sind einmal T-Effektorzellen entstanden, können diese jede Zelle erkennen, die das Antigen trägt, ob es sich nun um eine professionelle antigenpräsentierende Zellen handelt oder nicht.

Aufgabe der T-Effektorzellen ist die zelluläre Immunität, also das Eliminieren infizierter Zellen durch zytotoxische CD8-T-Zellen und die Aktivierung von Makrophagen durch inflammatorische CD4-T-Zellen. T-Helferzellen werden für die humorale Immunantwort, die Aktivierung der B-Zellen und die damit verbundene Antikörperproduktion benötigt.

Hat die T-Effektorzelle ein Antigen erkannt, sezerniert sie häufig Zytokine, auf deren Wirkung die Effektorfunktionen der T-Zellen beruhen. CD4-Helferzellen (T_H2) sezernieren B-Zell-aktivierende Zytokine, die Zytokine der T_H1 -Zellen aktivieren Makrophagen. CD8-T-Killerzellen setzen $INF-\gamma$ und weitere Zytotoxine frei.

Antigene von Pathogenen, die sich im Cytosol vermehren, werden von MHC-Klasse-I-Molekülen an die Zelloberfläche gebracht und den zytotoxischen CD8-T-Zellen präsentiert, die mit großer Präzision die infizierten Zellen töten. Sie wirken durch die Freisetzung von zwei Klassen vorgeformter Zytotoxine, deren Fragmente den programmierten Zelltod in jeder Zielzelle zu induzieren scheinen. Diese Fragmente gelangen durch das porenbildende Protein Perforin in die Zelle. Zytotoxische T-Zellen sezernieren auch Interferon- γ , das die virale Replikation hemmt und eine große Bedeutung für die Expression von MHC-Klasse I-Molekülen hat.

Antigene von Krankheitserregern, die in intrazellulären Vesikeln wachsen oder von extrazellulären Bakterien und Toxinen stammen, werden von MHC-Klasse II-Molekülen an die Zelloberfläche transportiert und den CD4-T-Zellen präsentiert, die dann entweder zu inflammatorischen T-Zellen (T_H1) differenzieren und infizierte Makrophagen aktivieren oder zu T-Helferzellen (T_H2), die durch Anregung bestimmter B-Zellen zur Antikörperproduktion beitragen. Die Aktivierung der Makrophagen durch CD4-T-Zellen erfolgt durch membrangebundene Signale von T_H1 -Zellen und durch das stark makrophagenaktivierende Zytokin Interferon- γ , das von diesen Zellen sezerniert wird. Wichtig ist die gleichzeitige Kontrolle der Makrophagen durch die T-Zelle, da es sonst durch mangelnde Präzision zu lokaler Gewebsschädigung kommen kann.

CD4–T–Zellen spielen also eine wichtige Rolle bei der Kontrolle und Koordination der Wirtsabwehr gegen intrazelluläre Keime.

Die T–Effektorzellen kontrollieren durch ihre Wechselwirkungen mit Zielzellen alle bekannten Effektormechanismen der adaptiven Immunantwort.

1.2.3 Der Infektionszyklus der Adenoviren

Der Infektionszyklus der Adenoviren ist aufgeteilt in 2 Phasen [3]:

Die Phase I (= Frühphase) erstreckt sich über eine Dauer von etwa 6–8 Stunden, beginnend mit der initialen Interaktion des Virus mit dem Rezeptor. Ihre Funktion ist das Eindringen des Virus via Clathrin–vermittelter Endozytose in die Wirtszelle. Es folgt eine direkte Bindung der viralen, hitzesensiblen Pentonbase an die zellulären Integrine unter Anwesenheit von divalenten Kationen. Zu weiteren Aufgaben der Phase I gehören der schnelle Transport des Virusgenoms durch Endosomen in das Zellzytoplasma und mit Hilfe von Dynein und Mikrotubuli durch eine Kernpore zum Nukleus. Dort wird es zur Kernmatrix geschleust. Ebenso fällt die Modulation der Zellfunktionen zur Vereinfachung der Replikation der Virus–DNA mit der darauf folgenden selektiven hocheffizienten Transkription und Translation in diese Phase. Das führt zu einer Ansammlung von Strukturproteinen im Nukleus und zur Reifung des infektiösen Virus.

Die Transkription ist ein ebenfalls zweiphasiger Prozeß, der sich, jeweils von zahlreichen Spaltprozessen begleitet, in eine Früh- und eine Spätphase aufteilt, beziehungsweise vor und nach der Virus–DNA–Replikation stattfindet.

Die Replikation erfolgt von beiden DNA-Enden aus und benötigt Sequenzen innerhalb der Inverted Terminal Repeats als Ausgangspunkt. Das führt zur Produktion von Strukturelementen des Virus, zur Kapselbildung und zur Reifung der Viruspartikel im Kern.

Die Phase II (= Spätphase) umfaßt einen Zeitraum von weiteren 4–6 Stunden, geht also weitaus schneller vonstatten als Phase I. Ihre Funktion ist das Hervorbringen des Virus.

Interferone sind zelluläre Proteine der Größe 15–35kDa, die in einer sehr frühen Phase einer Virusinfektion freigesetzt werden und einen gewissen Grad an

Zellspezifität aufweisen. Sie werden in zwei Gruppen aufgeteilt, Gruppe I enthält ausschließlich α - und β - Interferone, zu Gruppe II werden γ -Interferone gerechnet.

Ihre Aufgabe besteht in der Regulation der Virustranskription, somit sind sie Teil der zellulären Abwehrmechanismen gegen das Virus.

Bei einer Adenovirusinfektion erfolgt die Induktion der Interferone über die Interaktion mit den Strukturbestandteilen. Generell sind Adenoviren aber widerstandsfähig gegen Interferone, da sie selbst mit einer Anzahl von Abwehrmechanismen ausgestattet sind, induzieren sie so einen Interferon-Regulierungsfaktor im späteren Stadium der Infektion, der eine Rolle in der Zytopathogenität spielt.

1.2.4 Inzidenz einer Adenovirusinfektion

Adenovirusinfektionen nehmen bei Kindern nach Stammzelltransplantation zu. Die disproportionale Verteilung der Adenovirusinfektion kann nicht über die differierende Art der Stammzelltransplantation erklärt werden. Die Mehrheit der Schulkinder besitzt darüber hinaus Antikörper für mehr als einen Serotyp des Adenovirus.

Die Inzidenzrate einer Adenovirusinfektion nach Stammzelltransplantation liegt, je nach Studie variierend bei 3% [2], 12 % [9], wobei davon 83% innerhalb der ersten 100 Tage auftraten, bis zu 31,3% [12]. Daß die Inzidenz der Adenovirusinfektionen nach Stammzelltransplantation insgesamt gestiegen ist könnte den besseren Detektionsmöglichkeiten wie auch der ansteigenden Zahl von Hochrisikotransplantationen und intensiverer Immunsuppression zugeschrieben werden.

Im Vergleich zu Erwachsenen tritt bei pädiatrischen Patienten nach Stammzelltransplantation eine Infektion deutlich häufiger (31,3% zu 13,6%) und früher (mittlerer Erkrankungszeitpunkt: 30 zu 90 Tagen nach Transplantation) auf. Das belegt unter anderem ein Artikel von Flomenberg et al. [12].

Es ließen sich keine saisonalen Häufigkeiten in bestimmten Monaten feststellen [2].

Die höchste Inzidenz wurde bei Kindern bis 5 Jahren beobachtet [56].

Patienten, die mit autolog transplantiert wurden, hatten eine niedrigere Inzidenzrate als allogene Transplantatempfänger [2] wobei keine signifikanten Unterschiede der verschiedenen allogenen Transplantationen auffielen [9]. Patienten, die vor der Transplantation eine Ganzkörperbestrahlung (TBI = total body irradiation) erhielten, hatten eine um 14 Mal höhere Inzidenzrate als solche ohne TBI.

1.2.5 Klinische Manifestation des Adenovirus

Wie in verschiedenen Artikeln [6, 10, 11] dargestellt manifestiert sich das Virus vor allem in den oberen oder unteren Atemwegen, im Magen–Darm–Trakt, im Auge oder in der Blase, es kann Pneumonie, Colitis, Gastroenteritis, Hepatitis, Pankreatitis, Tonsillopharyngitis, Keratokonjunktivitis, Myokarditis induzieren [9, 21, 38, 55]. Eine Adenovirusinfektion manifestiert sich nach Stammzelltransplantation gravierender und von längerer Dauer [11] in Fieber, Diarrhoe, hämorrhagischer Zystitis, Nasopharyngeal- und Harnwegsinfekten, es kommen jedoch auch Hämaturie, hepatische Nekrose mit Leberversage oder ausgeprägte Lungenbeteiligung mit Pneumonie vor, die den Verlauf ungünstig beeinflussen [6, 8, 17, 19, 28, 37, 40, 46, 62, 64, 67]. Einem Artikel von Fioriti et al. zufolge scheint die hämorrhagische Zystitis jedoch eher einer Infektion mit dem humanen Polyomavirus BK zuzuschreiben zu sein [65], möglich scheint auch eine Assoziation mit dem simian virus 40 [70].

Der Zeitpunkt der Erstmanifestation variiert durchschnittlich von 18 [6] bis 41 Tagen [9, 2].

Übertragen werden kann der Virus durch Tröpfcheninfektion, jedoch ist eine Infektion auch über ein transplantiertes Organ vom Spender auf den Empfänger möglich. Entgegen der anfänglichen Befürchtungen gehört die Adenovirusinfektion nicht zu den nosokomialen Infektionen [41].

1.2.6 Adenovirusinfektion nach Stammzelltransplantation

Seit ihrer ersten Durchführung im Jahre 1959 in Seattle von Sir Donnall Thomas wird die Stammzelltransplantation als Therapieverfahren dazu benutzt. Nach vorheriger Zerstörung residualer Tumor-/ Leukämiezellen und der Suppression

der körpereigenen Immunabwehr werden hämatopoetische Stammzellen übertragen, um die Hämatopoese des Empfängers aus diesen transplantierten Zellen regenerieren zu lassen. Hier in der Aplasie-Phase teilen sich die infundierten Zellen in Tochterstammzellen und in Progenitorstammzellen, die sich zu antigenpräsentierenden Zellen differenzieren oder sich in die verschiedenen blutbildenden Linien aufteilen [13].

Ziel der Zellanreicherungsverfahren nach der Entnahme ist die hochselektive Anreicherung von humanen hämatopoetischen Stammzellen. Diese sind für CD34 und/oder AC133 positiv und negativ für linienspezifische Marker reiferer Zellpopulationen. Im allogenen Setting entfernt man reife immunkompetente T- und B-Zellen aus dem Transplantat, dieses Verfahren findet Anwendung bei haploidenter pädiatrischer Stammzelltransplantation.

Nach der Transplantation rekonstituieren in den ersten 4 Wochen die NK-Zellen. Dann erfolgt ein stetiges Ansteigen der T-/ B-Zellen. Nach etwa einem Jahr sind in der Regel die immunologischen Funktionen von T-/ B-Zellen wieder hergestellt und das anfangs inverse CD4-/ CD8- Verhältnis aufgehoben.

Indikationen einer Stammzelltransplantation sind hauptsächlich maligne und nicht-maligne Systemerkrankungen im Kindesalter. Die allogene Stammzelltransplantation wird z.B. eingesetzt und empfohlen bei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom, Diamond-Blackfan-Anämie, juveniler myelomonocytärer Leukämie, sekundärer akuter myeloischer Leukämie und bei Kindern mit chronisch myeloischer Leukämie [13].

Risikofaktoren für eine schwere virale Infektion sind alle Formen der Lymphopenie und Patienten mit verzögerter T-Zell-Rekonstitution. Besonders häufig treten Komplikationen in der Phase der Aplasie auf.

Ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer Komplikation haben Patienten mit Immundefizienzsyndromen oder Empfänger von hämatopoetischen Stammzelltransplantationen. Außerdem gehören der Nachweis einer Graft-versus-host-Reaktion, die Therapie mit Steroiden oder eine Antilymphozyten-immuntherapie zu den Risikofaktoren. Besteht eine vorausgegangene Exposition des Spenders oder Empfängers mit dem Virus oder liegt ein

seropositiver Nachweis von Adenovirus vor Transplantation oder eine Pilzinfektion vor, erhöht sich die Gefahr der Komplikationen ebenso [6, 8, 9, 25, 34].

Die Rekonstitution der Lymphozyten nach einer Transplantation scheint ausschlaggebend für die Eliminierung der Adenovirusinfektion zu sein [57, 59].

Um eine Abstoßungsreaktion zu vermeiden gibt es verschiedene Möglichkeiten. Bei einer Stammzelltransplantation kann jedoch grundsätzlich nicht auf die Immunsuppression verzichtet werden, wodurch jedoch das Graft versus Host-Risiko erhöht wird. Es sei an dieser Stelle nur kurz auf die Alternative zur Ganzkörperbestrahlung oder der Konditionierung mit Busulfan oder Alemtuzumab, Fludarabin und Cyclophosphamid vor der Stammzelltransplantation hingewiesen: Die Kombination von Fludarabin und Cyclophosphamid unter Induktionstherapie mit Cytarabin, Idarubicin und Etoposide sowie die Anreicherung des allogenen Transplantates mit CD34 positiven allogenen Stammzellen [30, 58, 68] und Antithymozyt-Globulin. Ebenso ein Kombinationsprogramm der Konditionierung von Stammzelltransplantation mit Bestrahlung und medikamentöser Therapie mit Thiotepa und Antithymozyt-Globulin [47, 48].

1.2.7 Nachweis von Adenoviren

In der PCR werden Oligonucleotide benutzt, um Basenpaare und bp-Fragmente, die für das Adenovirus-Hexon-Protein kodieren, zu amplifizieren. Sie ist eine schnelle Technik, um Adenovirus z.B. aus Abstrichen der Konjunktiven nachzuweisen [22, 49, 50, 66]. Dieses sichere Verfahren hat den Vorteil, daß eine Therapie-Verlaufskontrolle sehr einfach möglich ist und schon früh das Risiko einer disseminierten Adenovirus-Infektion erkannt werden kann [53]. Zellkulturen gehören weiterhin zu den besten Nachweisverfahren, jedoch sind sie technisch recht aufwendig und dauern länger als die PCR [19].

Die Isolation von Adenoviren erfolgt aber hauptsächlich über Stuhl- und Antigenen aus Urinproben [9, 6, 17, 18, 22]. Auch Proben aus bronchoalveolärer Lavage, Endotrachealaspiration, von Bindehaut, Knochenmark, Nasopharynx und Haut werden verwendet [3].

Adenovirus kann nach Probenentnahme ebenfalls durch Hybridisierungs-Assays nachgewiesen werden [39, 49], indem man die Basensequenz der Region des Hexongens benutzt, die für die gruppenspezifischen Determinanten kodieren. Eine Quantifizierung mittels hexonspezifischer TR-Fluoroimmunoassays ist kein sehr schneller Test aber dafür sehr sensitiv [17]. Abstriche werden aus Urin-, Stuhl- und Gewebeproben genommen. Die Frühzeitdiagnose der Adenovirusinfektion erfolgt u.a. durch gastrointestinale Biopsien, ebenso aus Nasopharynx- und Blutproben [22]. Zur frühest möglichen Diagnosestellung bei einer gastrointestinalen klinischen Symptomatik wird die rektale Biopsie hervorgehoben.

Neuere Möglichkeiten zur Detektion von Adenovirus sind die mRNA reverse Transkriptions-PCR und die SYBR Green real-time PCR, mit denen es möglich ist, eine niedrige Frequenz von infektiösem Adenovirus in Flüssigkeiten, Schmutzwasser, Nahrung und Luft schnell und sensitiv quantitativ nachzuweisen [51, 55, 57, 60].

1.2.8 Therapie

Die Adenovirusinfektion bleibt ein wesentlicher Grund der hohen Mortalität nach Stammzelltransplantation, gegen die es noch keine nachweislich erfolgreiche und effiziente Therapie gibt [2, 4, 21, 22, 63].

Einige Purin- und Pyrimidinanaloga haben einen positiven Einfluß auf die klinische Symptomatik [26]:

Cidofovir ist ein nephrotoxisches Monophosphatnucleotid-Analogon von Cytosin, das die virale DNA-Polymerase inhibiert nachdem es durch intrazelluläre Phosphorylierung in seine aktive Diphosphatform überführt wird.

Studien über die Effektivität einer Behandlung mit Cidofovir stellen außer einer in vitro-Effizienz zwar eine mögliche Langzeit-Virussuppression und eine Besserung der klinischen Symptome dar, können jedoch nicht eindeutig einen reproduzierbaren Erfolg nachweisen [21, 22, 24, 29]. Entscheidend scheint zu sein, daß die Diagnose so früh als möglich erfolgt und die Therapie dementsprechend unmittelbar danach begonnen werden kann.

Die Ribavirintherapie scheint laut optimistischer Artikel von Liles et al., Howard et al. und Miyamura et al. [9, 28, 31] Erfolge bei Patienten zu zeigen, deren Knochenmark einer HLA-identischen Geschwisterspende entstammt. Besserung der klinischen Symptome wie Fieber und Bronchitis wurden beobachtet [6, 31], kontrollierte klinische Studien existieren jedoch nicht.

Ribavirin wird als effizient bei hämorrhagischer Zystitis, Pneumonie und Gastroenteritis betrachtet, vor allem aber wenn das Virus so früh wie möglich isoliert werden konnte und eine sofortige Gabe des Medikamentes erfolgte. Die intravenöse Ribavirintherapie wird in einem Artikel von Murphy et al. [25] als alternative Therapiemöglichkeit bei hämorrhagischer Zystitis beschrieben wenn die konservative Therapie fehlgeschlagen ist. Andere Artikel belegen jedoch, daß bei ersten Disseminationszeichen einer Adenovirusinfektion durch Ribavirintherapie keinerlei Abfallen der DNA-Viruslast erreicht werden konnte [61].

Immunglobuline und Ganciclovir [6, 9], sowie Cyclosporin A und Methylprednisolon werden verwendet, jedoch ebenfalls ohne nachweislichen Erfolg [2]. Die respiratorischen Symptome können allenfalls symptomatisch mit Immunglobulinen und Corticosteroiden behandelt werden [42].

Trotz antibiotischer Therapie kommt es bei systemischer Infektion zu einem schnellen progressiven klinischen Verlauf [20]. Auch die Option der frühen Detektion ohne antivirale Therapie bei allen Patienten steht zur Diskussion [66].

Zusammenfassend kann man sagen, daß es noch keine wirklich effektive und reproduzierbare Therapie bei Adenovirus-Infektion nach Stammzelltransplantation gibt, es scheint jedoch so zu sein daß die Effektivität der jeweiligen Therapie maßgeblich vom Zeitpunkt des frühzeitigen Beginns abhängt [63, 64].

1.2.9 Mortalität einer Adenovirusinfektion nach Stammzelltransplantation

Die hohe Adenovirus-assoziierte Mortalität bei immunsupprimierten Patienten nach Infektion liegt, je nach Studie variierend, bei 6%-60%. Häufigste Ursache des fatalen Ausgangs ist Multiorganversagen. Die hohe Mortalität ist von Faktoren wie Ausbreitung und Lungen-/ Organbeteiligung abhängig [2, 4, 6, 8,

9, 26]. Lebensbedrohliche Hämorrhagien sind keine Seltenheit und die Pathogenität des Adenovirus muß im Bezug auf die Zeit nach Stammzelltransplantation durchaus sehr ernst genommen werden [33].

Es gibt bislang keine nachweisliche Assoziation oder einen abhängigen Risikofaktor zwischen einer Graft versus Host-Reaktion (GvHD) und einer Adenovirusinfektion [6, 9], jedoch kann beides koexistent vorhanden sein. Vermutungen zufolge könnte eine Adenovirusinfektion die GvHD triggern, die Immunsuppression bei GvHD und deren aggressive Immunsuppressionstherapie könnten das erhöhte Risiko einer viralen Infektion und deren Dissemination bedeuten [2, 6, 27].

Sowohl Adeno als auch das Cytomegalievirus sind besonders gefürchtet bei immunsupprimierten Patienten, da mit ähnlich ansteigenden Komplikationsrisiken nach Stammzelltransplantation wie Infektionen u.a. zu rechnen ist sie [10], ebenso haben sie eine ähnliche histopathologische und klinische Präsenz, was die Diagnostik erschwerend beeinflusst.

1.3 Immunrekonstitution nach Stammzelltransplantation

Die zelluläre Immunantwort besteht aus der Abwehr des Virus über CD8 positive zytotoxische T-Zellen und CD4 positive Helferzellen.

MHC (Haupthistokompatibilitäts-)–Antigene sind membrangebundene Moleküle, an denen Antigene gebunden und so den T-Lymphozyten präsentiert werden. Man unterscheidet zwei Klassen von MHC–Antigenen, die MHC-Klasse I–Antigene werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und bestehen aus einer leichten und einer schweren Kette. Sie binden nur Antigene, die im Innern der Zelle synthetisiert werden (z.B. Virusproteine) und werden von CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen erkannt.

Das führt zu einer Freisetzung von Perforin, die Zelle wird lysiert und die infizierten Zellen werden schon in einem sehr frühen Stadium der Infektion eliminiert, in dem das Virus noch nicht freigesetzt wurde [3].

Adenoviridae können durch das Zurückhalten der MHC–Antigene im endoplasmatischen Retikulum diesen Prozeß eindämmen.

MHC-Klasse II-Antigene werden von B-Lymphozyten, Phagozyten und Endothelzellen exprimiert. Sie bestehen aus zwei unterschiedlichen Polypeptidketten und präsentieren von außen (durch Phagozytose) aufgenommene Antigene, die durch CD4 positive T-Zellen erkannt werden. CD4 positive Helferzellen sind wichtig im Bezug auf die proliferative Immunantwort, sie stimulieren nach dem Wiedererkennen eines spezifischen Epitopes des körperfremden Antigens B-Zellen um eine massive Proliferation von Oberflächenimmunglobulinen für die humorale Immunantwort in Gang zu setzen.

Der Wirkungsgrad dieser humoralen Immunantwort spielt eine große Rolle in der Adenovirusgentherapie und hängt von der Natur der bereits existierenden Immunität ab [3].

Bei einer akuten Infektion steigt die Zahl der antigenspezifischen T-Zellen stark an, nach Bewältigung des Virus sinkt sie wieder. Die Anwesenheit von antigenspezifischen T-Zellen ist also ein Indikator für die Anwesenheit eines bestimmten Virus im Organismus [10]. Die Abwesenheit von virusspezifischer Immunität bedeutet also hypothetisch eine Abwesenheit des Virus oder eine pathologische Situation, in der das Virus anwesend ist aber nicht kontrolliert werden kann.

Die Adenovirus-spezifische T-Zellantwort sinkt im Alter. Nur 50% aller Testpersonen in der Studie von Sester et al. [10] hatten Adenovirus-spezifische T-Zellen über dem erfaßbaren Limit, die absolute Zahl der Virus-spezifischen T-Zellen waren bei jüngeren Testpersonen deutlich höher als bei älteren. Der Abfall der T-Zellantwort war Adenovirus-spezifisch und nicht aufgrund eines generellen Verlustes von Interferon- γ -produzierenden Zellen, da die proliferative Antwort der reaktiven T-Zellen gegenüber polyklonalen Stimuli wie z.B. Staphylokokken Enterotoxin B keinen Zusammenhang mit dem Alter aufwies und sich in den Altersgruppen nicht unterschied. Trotz des Abfalls der Adenovirus-spezifischen Immunantwort, der niedrigeren Interferon- γ -Sekretion, der Verminderung der proliferativen Antwort und des Immunglobulin G Titers, traten bei älteren Testpersonen dennoch seltener infektiöse Komplikationen auf. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß der Keim im Laufe des Lebens eliminiert

werden kann. Im Gegensatz dazu sind Komplikationen im jugendlichen Alter weitaus häufiger, was durch die deutlich höhere Rate an Primärinfektionen erklärt wird [10].

Das Hauptproblem der Adenovirusinfektion nach Stammzelltransplantation ist die verzögerte T-Zell-Rekonstitution der Patienten.

Deutlich erschwerend im klinischen Umgang mit einer Infektion ist ebenfalls, daß manche Patienten ihre Erkrankung in den Griff bekommen, andere wiederum einem Multiorganversagen erliegen [10]

Die Anwesenheit von Adenovirus-spezifischen zytotoxischen T-Zellen in gesunden Spendern eröffnet die Möglichkeit einer adjuvanten Immuntherapie nach allogener Stammzelltransplantation, die auf einer Infusion von virusspezifischen Lymphozyten des Spenders basiert.

Die zelluläre Immunantwort ist wichtig zur Entdeckung einer akuten Adenovirus-Infektion. Dazu wurde ein sensitiver Assay entwickelt, um die Adenovirus-spezifische proliferative T-Zellantwort zu ermitteln. Hierbei stellte sich heraus, daß Adenovirus-spezifische CD4⁺ T-Zellen Antigene unter verschiedenen Serotypen erkennen und daß die Mehrheit der exponierten Personen langlebige CD4⁺ T-Zellantworten auf Adenovirus entwickelt. Die Adenovirus spezifische Proliferation wird durch die CD4⁺ T-Zellen vermittelt [23].

Den Ergebnissen einer Studie von Zintl et al.[54] zufolge erreichten absolute Lymphozytenanzahl, B- und T3-Lymphozyten normale Werte 6 Monate nach einer Stammzelltransplantation. Die T4-Lymphozytenanzahl sank erheblich innerhalb der ersten 180 Tage, ebenso befand sich der T4/T8-Quotient für die Dauer von durchschnittlich 48 Monaten unter 0,8. Nach 6 Monaten stieg die T8-Leukozytenzahl auf überhöhte Werte an.

1.4 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Regeneration Adenovirus-spezifischer T-Zellen nach allogener Stammzelltransplantation bei Kindern zu untersuchen.

Sie soll mittels Interferon- γ -Sekretion nach Antigen-spezifischer Stimulation bestimmt werden.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. Kann eine Adenovirus-spezifische T-Zellaktivierung ex vivo bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation im peripheren Blut bestimmt werden?
2. Wie kann man diese Regeneration quantitativ erfassen?
3. In dieser Arbeit wurde die Zytokin-Sekretion von T-Zellen und die intrazelluläre Zytokinfärbung gewählt, um die Frequenz der Adenovirus-spezifischen T-Zellen zu detektieren. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, wann genau der Zeitpunkt ihres ersten Auftretens ist.
4. Wie ist die zeitliche Entwicklung der spezifischen T-Zellantwort nach Stammzelltransplantation?
5. Zu untersuchen ist auch, ob die spezifischen T-Zellen der Patienten mit den T-Zellen gesunder Spender vergleichbar sind, da nach Stammzelltransplantation eine unspezifische Hemmung der T-Zellaktivierung beschrieben ist.
6. Sind die Zellen, die wir messen, überhaupt Adenovirus-spezifisch?
7. Es soll noch der Frage nachgegangen werden, ob es individuelle Unterschiede in der T-Zell-Regeneration der Patienten nach einer Transplantation gibt. Damit stellt sich auch die Frage bezüglich der Unterschiede in der Regeneration, ob eine nach Stammzelltransplantation detektierte Adenovirusinfektion diese Regeneration beeinflusst und ob die Regeneration zum Stillstand kommt oder sogar rückläufig ist.

8. Da deutliche Unterschiede in der T-Zell-Regeneration in der Literatur beschrieben sind, sollte bei vorhandenen gemessenen Unterschieden weiterhin herausgefunden werden, wovon diese abhängen. Hierbei sollte untersucht werden, ob die Regeneration der Adenovirus-spezifischen T-Zellen in Abhängigkeit steht zur Art des Spenders (HLA-identische Geschwisterspender oder HLA-identische Fremdspender, haploidentische Familienspender) oder zur Art des Transplantates und dessen Anreicherung (unselektioniertes Knochenmark, selektionierte CD 34 angereicherte Stammzellen mit oder ohne zusätzliche T-Zellgaben).
9. In wieweit sind die beiden Aufbereitungsmethoden der Bestimmung der Zytokinsekretion und die der intrazellulären Zytokinfärbung miteinander vergleichbar?
10. Zuletzt steht noch die Frage, ob aufgrund der Messung Adenovirus-spezifischer T-Zellen eine spezifischere Aussage über den Immunstatus im Bezug auf den Schutz vor Adenovirusinfektionen gemacht werden kann, was zukünftig ein differenziertere diagnostische und therapeutische Vorgehensweise nach einer Stammzelltransplantation ermöglichen könnte.

2 Material und Methoden

Die Patienten wurden in der Zeitspanne zwischen 1996 und 2003 transplantiert und waren im Alter von 3 Monaten bis 19 Jahren (Mittelwert: 9,49 Jahre; Standardabweichung: 5,96).

2.1 Patienten und Probanden

Untersucht wurde im Zeitraum zwischen Februar 2002 und Dezember 2003 das Blut von 53 pädiatrischen Patienten der Universitätskinderklinik Tübingen im Alter von 3 Monaten bis 22 Jahren (Mittelwert $9,49 \pm 5,96$ Jahre), die zwischen 1996 und 2003 allogene Stammzelltransplantation wurden. Das obenstehende Alter der Patienten bezieht sich auf den Zeitpunkt ihrer Transplantation. Die Auswahl der Patienten erfolgte aufgrund des Kriteriums Zustand nach allogener Stammzelltransplantation (SZT) innerhalb dieser Zeit.

Grunderkrankungen der Patienten waren akute lymphatische Leukämie (ALL), Wiscott–Aldrich–Syndrom (WAS), juvenile myelo-monocytäre Leukämie (JMML), Osteopetrose (OP), Diamond Blackfan–Anämie (DBA), myelodysplastisches Syndrom (MDS), schwere aplastische Anämie (SAA), Rhabdomyosarkom (RMS) und chronisch lymphatische Leukämie (CLL) erhielten. Es wurde peripheres Blut wenn möglich vor SZT und jeweils 30, 60, 100, 200, 365 und >365 Tage nach der Transplantation entnommen.

Die Spender waren zu 26,5% HLA–identische Geschwisterspender (sib), zu 48,9% HLA–identische Fremdspender (MUD) und zu 24,5% haploidentische Familienspender (Vater, Mutter) mit 1-3 HLA–Mismatch.

Von den Patienten waren 75 % Jungen und 25% Mädchen.

30,7 % wurden mit unselektioniertem Knochenmark transplantiert, 50 % mit selektionierten Stammzellen aus Leukoapheresat und 19,2 % bekamen zusätzlich zu CD34 selektionierten Stammzellen T–Zellgaben von $> 10^6$ / kg Körpergewicht.

Zum Nachweis einer Adenovirusinfektion wurden bei den Patienten Abstriche aus Rachen, Urin oder Stuhl genommen, ebenso aus dem Blutplasma, und ein PCR (Polymerase Chain Reaction)-Nachweis gemacht.

Tabelle 1: Patientenspezifische Daten

Nummer	Sex	Alter	Spender	Graft	Diagnose
1	M	10,9	MUD	KM	MDS
2	M	1	Haplo	CD34	OP
3	M	12,3	MUD	CD34	SAA
4	M	8,3	Haplo	CD34	ALL
5	M	8,9	MUD	KM	ALL
6	F	3,8	Auto	CD34	Neuroblastom
7	M	12,9	Sib	KM	AML
8	F	5,5	MUD	CD34	JMML
9	M	1,3	MUD	KM	WAS
10	F	15,8	MUD	CD34+T	MDS
11	M	22,7	MUD	CD34	ALL
12	M	22,2	MUD	CD34	ALL
13	M	0,3	MUD	CD34	OP
14	M	0,6	Sib	KM	OP
15	M	7,2	Haplo	CD34	JMML
16	M	15,7	Sib	CD34	MDS
17	M	8,2	Sib	KM	ALL
18	F	8,3	Sib	KM	ALL
19	M	0,8	MUD	CD34+T	ALL
20	M	15,6	Haplo	CD34	ALL
21	F	7,1	MUD	KM	ALL
22	M	6	MUD	CD34	ALL
23	M	9,5	Haplo	CD34	nb
24	F	5,6	Haplo	CD34	ALL/Non-Hodgkin
25	M	9	Haplo	CD34	ALL
26	M	5,9	MUD	CD34	ALD
27	M	10,5	Haplo	CD34	ALL
28	M	10,2	Auto	CD34	ALL
29	M	13,2	Sib	CD34	ALL
30	M	16,4	MUD	CD34+T	CML
31	M	0,3	Haplo	CD34	OP
32	M	8,9	Haplo	CD34	ALL
33	M	3,6	Sib	KM	ALL
34	M	4,3	MUD	CD34	DBA
35	F	15,6	Sib	KM	RMS
36	M	8,2	MUD	KM	ALL
37	M	4	Haplo	CD34	ALL
38	M	15,8	Sib	CD34+T	MDS
39	F	15,6	Sib	CD34	MDS
40	F	7,2	Sib	KM	ALL
41	F	1,9	Sib	KM	DBA
42	F	17,3	MUD	CD34+T	AML
43	M	5,8	MUD	KM	ALL
44	M	11,5	MUD	CD34+T	Anaplast.Syndrom
45	F	9,5	nb	nb	ALL
46	M	1,7	Sib	KM	JMML
47	M	14,5	MUD	CD34+T	ALL
48	M	8,8	MUD	KM	ALL
49	F	17,2	MUD	CD34+T	RMS
50	M	18,2	Haplo	CD34	ALL
51	M	7,1	MUD	CD34+T	AML
52	M	19	Sib	Cd34	ALL
53	M	11,6	MUD	CD34+T	nb

Legende: Alter= in Jahren angegeben

M = männlich

F = weiblich

MUD= matched unrelated donor

sib = sibling (HLA-ident. Geschwisterspender)

haplo = hapoidentischer Familienspender (Eltern)

KM = unselektionierte Knochenmarkspende
CD34 = CD34-selektionierte Stammzellspende
CD34 + T = CD34 selektionierte Stammzellspende + zusätzliche T-Zellgaben
ALL = akute lymphatische Leukämie
MDS = myelodysplastisches Syndrom
OP = Osteopetrose
SAA = schwere aplastische Anämie
AML = akute myeloische Leukämie
JMML = juvenile myelo – monocytäre Leukämie
WAS = Wiscott–Aldrich–Syndrom
RMS = Rhabdomyosarkom
Nb= nicht bekannt

Zur Probengewinnung wurden 3 ml heparinisiertes Vollblut entnommen, die in Portionen von jeweils 500 µl in drei 15 ml Greiner Falcon–Röhrchen stimuliert und dann zur Inkubation in den Brutschrank (Temperatur: 37°C) gestellt wurden. (siehe Methodenteil)

Tabelle 2: Gesunde Spender

Nummer	Bemerkung	Alter
1	F+P	nb
2	CSA	23
3	CSA	41
4	CSA	42
5	CSA	43
6	CSA	nb
7	CSA	nb
8	CSA	nb
9	F+P	nb
10	CSA	23
11	CSA	24
12	CSA	46
13	F+P	nb
14	CSA	nb
15	CSA	22
16	CSA	35
17	CSA	nb
18	CSA	22
19	F+P	29
20	CSA	nb
21	CSA	nb
22	CSA	nb
23	CSA	nb
24	CSA	24
25	CSA	17
26	CSA	nb
27	CSA	nb
28	CSA	41
29	CSA	9
30	CSA	24
31	CSA	23
32	F+P	55
33	CSA	55
34	CSA	nb
35	CSA	nb
36	CSA	23
37	CSA	nb
38	F+P	9
39	F+P	nb
40	CSA	33
41	CSA	37

Legende

CSA = intrazelluläre Zytokinfärbung (spezielle Färbe- und Bearbeitungsmethode, siehe Material und Methodenteil)

F+P = Zytokin-Sekretionsassay (spezielle Färbe- und Bearbeitungsmethode, siehe Material und Methoden)

Nb = nicht bekannt

2.2 Material

2.2.1 Reagenzienverzeichnis

- **CD3 APC:** (SK7) Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, USA, Ref.N°: 345767
- **CD4 FITC:** Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, USA, Cat.N°:340133
- **CD68 APC:** Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, USA, Cat.N°: 340560
- **CD8 FITC:** (SK1) Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, USA, Ref.N°: 345772
- **CD 28 Antikörper:** Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, USA; Cat.N°: 340975
- **FACS-Röhrchen:** (12x75), Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland, Art.N°: 35205261300635
- **SEB (Staphylokokken Enterotoxin B):** Sigma Chemical Co. P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, USA, Cas N°: 11100-45-1, Lot 090K4068, S-4881
- **15 ml Greiner-Röhrchen:** (17x120), Art.N°: 18827103002852
- **50 ml Greiner Röhrchen:** (30x115), Art.N°: 21026103000018
- **INF- γ Catch Reagent:** MitenyiBiotec GmbH (MACS), Bergisch Gladbach, Deutschland, Mat.N°: 120-000-459
- **INF- γ Detection Antibody (PE):** MitenyiBiotec GmbH (MACS), Bergisch Gladbach, Deutschland, Mat.N°: 120-000-460
- **Medium:** VLE RPMI 1640, Biochrom AG; Berlin; Cat.N°: F 1415

- **Mouse Ig G1 APC:** Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, USA, Ca.N°: 340442
- **Mouse Ig G2a PerCP:** Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, USA, Cat.N°: 349054
- **Puffer:** DBPS (Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline) ; 0,0095M (PO4), Bio Whittaker Europe, Cat N°: BE17-512F
- **Simultest γ 1 FITC/ γ 2a PE:** Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, USA , Cat.N°: 342409
- **Fix&Perm Reagenzien A und B :** Fix&Perm Cell Permeabilization Kits: CALLTAG Laboratories Burlingame, CA9410
- **Adenovirus Antigen:** Bio Whittaker, Walkersville, Maryland 21793, USA; Cat.N°: 30-800J
- **MOK-Reagenz:** Bio Whittaker, Walkersville, Maryland 21793, USA; Cat.N°: 30-801J
- **Handschuhe:** Safe Skin, Kimberly – Clark, Roswell, GA 30076, USA, made in Thailand, Ref: SP220E

Medium:

- **VLE RPMI 1640 Medium:** Biochrom AG, Berlin, Germany, Cat.No: F1415, Lot No:890FF
- **Albumin-Lösung:** 5 BaWü, DRK-Blutspendedienst BaWü, Baden-Baden, Germany, CH.-B: 1035195303
- **L-Glutamin:** Biochrom AG, Berlin, Germany, Cat.No: K0282; Lot No: 124FF
- **Penicillin/ Streptomycin:** Biochrom AG, Berlin, Germany, Cat.No: A2213; Lot.No: 636F
- **FACS™- Lyse – Reagenz:** Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, USA, Cat.No: 349202; Lot: 82143

2.2.2 Geräte

- **Software für das Durchflußzytometer:** Becton Dickinson, Cell Quest 3.3
- **FACS–Calibur Durchflußzytometer:** Becton Dickinson Biosciences; San Jose, USA
- **Zentrifuge,** Hettich, Tuttlingen, Deutschland, Rotixa 50 RS
- **Vortex:** Titramax 100, Heidolph, Germany, No: 544.11200.001, Ser.No: 039902613
- **Brutschrank:** Hera cell, Heraeus Instruments GmbH, Fellbach, Germany

2.2.3 Hintergrund Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ermöglicht die simultane Darstellung verschiedener Zellepitope in einer Zellsuspension auf Einzelzellebene. Die Suspension wird dazu von dem Meßgerät mit Überdruck in eine Meßküvette eingeführt und die Zellen werden stark beschleunigt. Dabei trennen sich Aggregate auf und die Zellen können sequentiell durch einen Laserstrahl geführt werden. Dabei werden Streuungseffekte der Zellen und Fluoreszenzen der verwendeten fluoreszierenden Antikörper gemessen.

Faktoren, die auf die Lichtstreuung Einfluß nehmen, sind Zellgröße, Struktur der Zellmembran und intrazelluläre Bestandteile. Das Vorwärtsstreulicht (forward light scatter, FCS) ist ein Maß für die Zellgröße, während das dazu im rechten Winkel gestreute Seitwärtslicht (side scatter, SSC) von der intrazellulären Granularität abhängt. Es ergibt sich in der Darstellung Seitwärtsstreulicht gegen Vorwärtsstreulicht für Vollblut eine charakteristische Aufteilung der Zellen, in der Lymphozyten von Monozyten und Granulozyten unterschieden werden können.

Zur immunologischen Phänotypisierung werden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern inkubiert, an die fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt sind. Verwendet man unterschiedlich markierte Antikörper, können mehrere Antigene auf einer Zelle gleichzeitig nachgewiesen werden. Voraussetzung dafür ist jedoch neben einer gemeinsamen Anregbarkeit der Farbstoffe bei einer bestimmten Wellenlänge, daß die Gipfel der einzelnen Emissionsmaxima deutlich unterschiedlich sind und so mit verschiedenen Detektoren getrennt voneinander in bestimmten Kanälen gemessen werden können. Moderne FACS-Geräte besitzen deshalb mehrere Laser mit unterschiedlicher Wellenlänge, so daß sich das Spektrum der gleichzeitig einsetzbaren Farbstoffe deutlich erweitert. Häufig verwendete Farbstoffe sind z.B. Fluorescein-isothiocyanid (FITC), Phycoerythrin (PE), PerCP oder Allophycocyanin (APC). Das für die Messungen dieser Arbeit verwendete Gerät arbeitet mit zwei Lasern und es können bis zu vier verschiedene Farbstoffe gleichzeitig verwendet werden.

Die Fluoreszenzintensität ist ein Maß für die Anzahl der gebundenen Antikörper auf der Zelle. Da die meisten Zellen auch ohne eine Anfärbung eine gewisse Autofluoreszenz zeigen, muß immer eine Kontrolle der Zellen gemessen werden und damit festgelegt werden kann, ab welcher Fluoreszenzintensität die Zelle als positiv gelten, d.h. die Fluoreszenz auf den gebundenen Antikörper und den entsprechenden Farbstoff zurückgeführt werden kann.

Es gibt unterschiedliche Darstellungsmöglichkeiten der Ergebnisse der Durchflußzytometrie. Zum einen die Dot Plot–Darstellung wie im unten stehenden Beispiel, den ich in dieser Arbeit gewählt habe, in der jeder Punkt einer Zelle entspricht. Im Density Plot werden die Zellen aufeinander dargestellt und die Farbunterschiede ausgewertet. Außer diesen beiden Darstellungen gibt es noch den Konturplot.

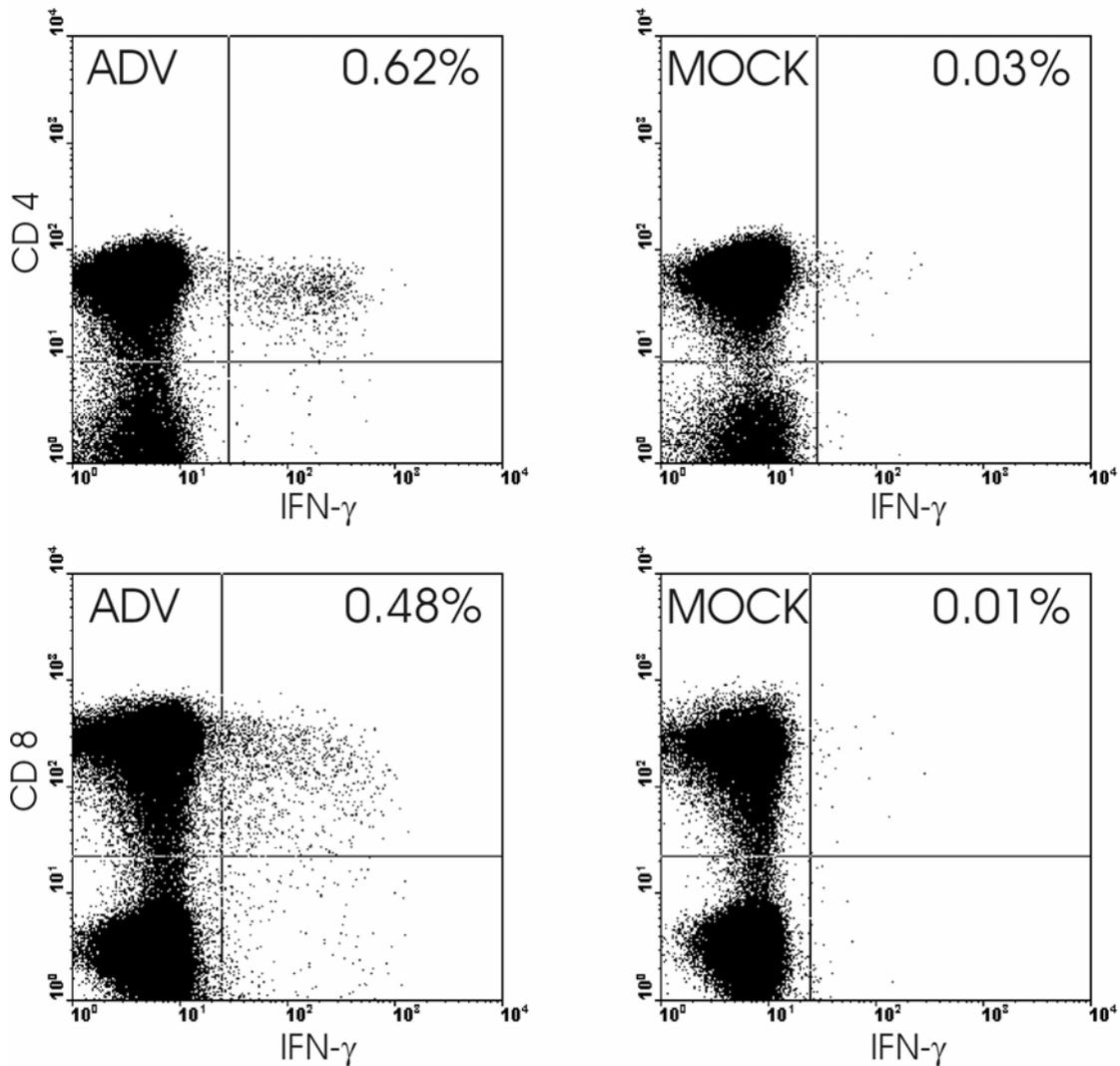


Abbildung 1: Beispielhafte Darstellung einer Auswertung der im Durchflußzytometer gemessenen Daten. Interferon- γ ist gegen CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen aufgetragen ist. Es handelt sich um die Röhren des Kontrollantigens, das aus MOK-infizierten Zellen stammt, die Negativkontrolle. Eine Positivkontrolle wurde mit Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) durchgeführt.

Legende: MOCK = MOK = Kontrollantigen

ADV = Adenovirus

2.3 Methoden

2.3.1 Prinzip

Intrazelluläre Zytokinfärbung:

Hauptanwendung des Zytokin-Sekretionsassay besteht in der Detektion, dem Isolieren und Analysieren von vitalen Leukozyten basierend auf der Sekretion von Zytokinen wie Interferon gamma (INF- γ), Interleukin 4 oder Interleukin 10. Nach Stimulation mit dem Antigen kann durch Induktion der Zytokin-Sekretion eine Detektion der Antigen-spezifischen T-Zellen erfolgen.

Um die Zytokin-Sekretion anzuregen wird die Zellprobe (z.B. Peripheral blood mononuclear cells = PBMC) mit einem spezifischen Antigen für 3-16 Stunden stimuliert. Ein zugegebenes Catch Reagenz heftet sich an die Leukozyten-Zelloberfläche (CD45) und während einer kurzen Inkubationszeit binden die Zytokine an das Catch Reagenz. Dann werden die Zellen mit einem Zytokin-spezifischen Antikörper versehen, der an Phycoerythrin =PE gebunden ist, und können im Durchflußzytometer analysiert werden.

Für die darauf folgende Costimulation des Vollblutes mit Anti-CD 28 werden 495 μ l PBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline) mit 5 μ l Anti-CD 28 1: 100 verdünnt ($c = 10 \mu\text{l} / \text{ml}$) und jeweils 50 μ l dieses Gemisches jedem 3 Röhrchen mit Vollblut zugegeben, was einer Konzentration von $c = 1 \mu\text{g} / \text{ml}$ in 500 μ l Vollblut entspricht und einer Konzentration von $c = \frac{1}{2} \mu\text{g} \text{ CD } 28$.

50 μ l Aqua dest. aus dem « Brefeldinröhrchen » werden in das Brefeldin Aliquot gegeben (Aliquot vorhanden: 50 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ Brefeldin in Ethanol), woraus sich eine Konzentration von $c = 0,5 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ Brefeldin in 100 μ l ergibt.

2.3.2 Antigen-spezifische Stimulation

Für eine antigen-spezifische Stimulation werden die T-Zellen mit Anti-CD 28 ($c = 1 \mu\text{g} / \text{ml}$ in 500 μ l Vollblut) costimuliert.

Verdünnung: 1:100 Anti – CD 28: 495 μ l Puffer + 5 μ l Anti – CD28 $\rightarrow c = 1 \mu\text{g} / \text{ml}$.

Die Blutzellen wurden mit einem Kontrollantigen stimuliert, das aus MOK-infizierten Zellen stammte ($c = 60 \mu\text{l}/\text{ml}$). Dies ist die Negativkontrolle. Eine Positivkontrolle wurde mit Staphylokokken Enterotoxin B (SEB, $c = 20 \mu\text{l}/\text{ml}$) durchgeführt.

Dann erfolgt eine Inkubation bei 37°C im Brutschrank von ≥ 16 Stunden.

2.3.3 Zytokin-Sekretionsassay

Nach der vorgegebenen Inkubationszeit von ≥ 16 Stunden werden die vorbereiteten 3 Proben (ADV, MOK, SEB) im Vortex verrührt, mit Puffer auf 10 ml aufgefüllt und 10 min. bei 4°C und 300g zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes werden $80\mu\text{l}$ kaltes Medium je nach Bedarf und $10 \mu\text{l}$ der zytokinen Catch Reagenz hinzugefügt. Nach gutem Verrühren und anschließender 5 minütiger Inkubation auf dem Schüttler auf Eis werden die Proben mit warmem Medium auf 10 ml aufgefüllt und 45 Minuten lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Hierbei ist auf eine möglichst kontinuierliche Durchmischung zu achten.

Nach dieser Zeit wird mit kaltem Puffer auf 15 ml aufgefüllt und erneut 10 min. lang bei 300g und 4°C zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wird nun der Restinhalt in die FACS-Röhrchen mit der Beschriftung Kontrolle, MOK, ADV8, ADV4, CD69, SEB aufgeteilt und bei Bedarf in 100μ kaltem Puffer resuspendiert.

Die nun anschließende Antikörperfärbung-Färbung geht nach folgendem Schema von statten: (INF- γ PE= Cytokine Detection Antibody)

Tabelle 3: Färbeschema der Antikörperfärbung

Antikörper	Kontrolle	MOK	ADV8	ADV4	SEB	CD69
FITC CD8	∅	10µl	10µl	∅	10µl	10µl
FITC CD4	∅	∅	∅	10µl	∅	∅
INF-γ PE	∅	10µl	10µl	10µl	10µl	10µl
APC CD3	∅	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl
IgG1/G2a FITC/ PE	10µl	∅	∅	∅	∅	∅
IgG2a PerCP	10µl	∅	∅	∅	∅	∅
IgG1 APC	5µl	∅	∅	∅	∅	∅
CD69 APC	∅	∅	∅	∅	∅	5µl

Legende:

PE= Phycoerythrin

MOK= Negativkontrolle

PerCP= Peridinin chlorophyl protein

SEB= Positivkontrolle, Staphylo-
kokken Enterotoxin B

APC= Allophycocyanin

FITC= Fluoresceinisothiocyanid

Nach dem Färben werden die Proben gut durchgemischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dieser Zeit werden die Erythrozyten in 4 ml einer Erythrozytenlyse-Reagenz lysiert. Nach 10minütiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur und eventueller mechanischer Lyse durch eine Pipette werden die Proben erneut mit kaltem Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (300g, 10 min., 4°C).

Nach Abkippen des Überstandes wird mit 2 Hüben FACS-Puffer resuspendiert und 10 Minuten zentrifugiert.

Zum Schluß wird nun der Überstand abgekippt und ca. 3 Tropfen (~0,5ml) FACS-Puffer hinzugefügt.

Vor der Messung im Durchflußzytometer wird allen Proben außer der Kontrolle noch Propidiumiodid zugegeben, um die Apoptose zu quantifizieren.

2.3.4 Prinzip der intrazellulären Zytokinfärbung

Fix und Perm: Reagenz A (Paraformaldehyd) ist dazu vorgesehen, die Zellen in Suspension zu fixieren, Reagenz B (Saponin) als Detergenz zur Permeabilisierung der Zellmembran. Durch diesen Vorgang können die Antikörper zu den intrazellulären Strukturen vordringen ohne die morphologischen Zellcharakteristika zu verändern.

Brefeldin A verhindert, daß stimulatorische Zytokine oder Zelloberflächen-Adhäsionsmoleküle sezerniert werden oder an die Zelloberfläche dieser Kulturen transportiert werden [14].

Das Verfahren dient der intrazellulären Antigen-Analyse mittels Durchflußzytometrie.

2.3.5 Stimulation

Für eine antigenspezifische Stimulation werden die T-Zellen mit Anti-CD 28 ($c = 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ in $500 \mu\text{l}$ Vollblut) costimuliert.

Verdünnung: 1:100 Anti-CD 28: $495 \mu\text{l}$ Puffer + $5 \mu\text{l}$ Anti-CD28 $\rightarrow c = 1 \mu\text{g}/\text{ml}$

Der Negativ-Kontrolle wird MOK-Reagenz ($c = 60 \mu\text{l}/\text{ml}$) hinzugefügt, eine Positiv-Kontrolle wird mit Staphylokokken Enterotoxin B (SEB, $c = 20 \mu\text{l}/\text{ml}$) durchgeführt.

Dann erfolgt eine Inkubation bei 37°C im Brutschrank von ≥ 16 Stunden.

Während der Inkubation und vor Beginn des eigentlichen Arbeitsablaufes jedoch muß Brefeldinlösung mit einer Konzentration von $c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Brefeldin in $100 \mu\text{l}$ zugegeben werden.

Genau 4 Stunden vor dem Beginn des Arbeitsablaufes wird nun Brefeldin in folgender Menge zugegeben:

Tabelle 4: Berechnung der Brefeldinkonzentration

MOK	500 µl Vollblut	5 µg Brefeldin = 10µl
ADV	750 µl Vollblut	7,5 µg Brefeldin = 15µl
SEB	250 µl Vollblut	2,5 µg Brefeldin = 5µl

Legende: MOK= Negativkontrolle

ADV= Adenovirus

SEB= Staphylokokken Enterotoxin B

Die Röhrcchen werden wieder in den Brutschrank gestellt.

2.3.6 Intrazelluläre Zytokinfärbung

4–6 Stunden nach der Brefeldin–Zugabe und nach der vorgegebenen Gesamtinkubationszeit werden die vorbereiteten 3 Proben (ADV, MOK, SEB) gut durchgemischt, mit Puffer auf 10 ml aufgefüllt und 10 min. bei 20°C und 300g zentrifugiert. Der Überstand muß nun vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt werden. Nun erfolgt eine Aufteilung auf 6 FACS–Röhrcchen mit der Beschriftung KO, MOK, ADV8, ADV4, CD69 und SEB. Die anschließende Antikörperfärbung wird nach folgendem Schema durchgeführt:

Tabelle 5: Antikörperfärbung der intrazellulären Zytokinfärbung

Antikörper	Kontrolle	MOK	ADV8	ADV4	SEB	CD69
FITC CD8	∅	10µl	10µl	∅	10µl	10µl
FITC CD4	∅	∅	∅	10µl	∅	∅
APC CD3	∅	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl
IgG1/G2a-FITC/ PE	10µl	∅	∅	∅	∅	∅
IgG2a-PerCP	10µl	∅	∅	∅	∅	∅
IgG1 APC	5µl	∅	∅	∅	∅	∅
CD69 APC	∅	∅	∅	∅	∅	5µl

Legende: PE= Phycoerythrin

FITC= Fluoresceinisothiocyanid

PerCP= Peridinin chlorophyl protein

APC= Allophycocyanin

Nach gutem Verrühren werden jeweils 100µl von Reagenz A in jedes der 6 Proben hinzugefügt. Auf ein erneutes Durchmischen folgt eine 15minütige Inkubation in Dunkelheit bei Raumtemperatur. Danach werden die Proben mit Puffer aufgefüllt, 10 Minuten bei 300g und 20°C zentrifugiert und der Überstand wird vorsichtig abgeschüttet. Nachfolgend wird in jede der 6 Proben jeweils 100µl Reagenz B zugegeben, gut durchmischt und manuell mit einer Pipettenspitze lysiert. Anschließend an eine 15 minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wird kontrolliert ob alle Erythrozyten lysiert sind (eventuelle Zugabe von Lysereagenz), mit Puffer aufgefüllt und nach Zentrifugation unter bekannten Bedingungen der Überstand abgegossen. Abschließend werden noch 3 Tropfen (~0,5ml) FACS-Puffer in alle Röhrchen zugegeben und im Durchflußzytometer gemessen.

Vor der Messung im Durchflußzytometer wird allen Proben außer der Kontrolle noch Propidiumiodid zugegeben um die Apoptose zu quantifizieren.

2.3.7 Messung und Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung

Die Messung erfolgte mit dem Durchflußzytometer FACSCalibur, die Auswertung mit der zugehörigen Software CellQuest. Ausgehend von Routineeinstellungen werden die genauen Messeinstellungen anhand der Kontrollen durchgeführt:

Die Verstärkerspannungen für das Vorwärtsstreulicht (FSC) und das Seitwärtslicht (SSC) werden so eingestellt, daß in der Darstellung SSC gegen FSC (SSC: y-Achse, FSC: x-Achse) die übliche Zellverteilung zustande kommt, in der man Lymphozyten von Monozyten und Granulozyten unterscheiden kann. Um die Zielpopulation, die Lymphozyten, kann in dieser Darstellung ein sogenanntes Gate gesetzt werden; die erlaubt die Darstellung nur dieser Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz in einem weiteren Diagramm. Ein Livegate wurde während der Messung auf lymphoide Zellen in Scattereigenschaften gesetzt. Anhand der Kontrollfärbung werden nun die Verstärkerspannungen der verschiedenen Messkanäle so eingestellt, daß sich die Zellen im jeweiligen Kanal zwischen 10^0 und 10^1 der Fluoreszenzskala befinden. Nach der Geräteeinstellung erfolgt die Messung der Proben. Zur

Auswertung wird wieder ein Gate auf die Lyphozytenpopulation gesetzt; diese Zellen werden dann in einem weiteren Diagramm hinsichtlich ihrer Fluoreszenz dargestellt, wobei immer zwei Kanäle gegeneinander dargestellt, z.B. FITC gegen PE.

Insgesamt wurden pro Probe 100 000 Zellen gemessen.

2.3.8 Berechnung von Signifikanz, Mittelwert und Standardabweichung

Mittelwert und Standardabweichung wurden mit Hilfe des Programms Excel berechnet. Die Darstellungsart dieser beiden Variablen im Ergebnisteil ist Folgende: Mittelwert \pm Standardabweichung.

Die Signifikanz des Vergleichs der beiden Bearbeitungsmethoden wurde mit Hilfe des Graphikprogramms GraphPad Prism errechnet mit dem Wilcoxon matched pairs test (t-test, non-parametrischer Test, keine Gaußverteilung). Bei dem Wilcoxon-Test handelt es sich um einen verteilungsfreien Signifikanztest, der zwei Gruppen, die nicht unabhängig voneinander ausgewählt wurden auf einen Unterschied bezüglich ihrer zentralen Tendenz eines ordinalskalierten Merkmals untersucht. Mit diesem statistischen Test wurden 3 Paare verglichen, CD3⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen, alle jeweils mit dem Zytokin-Sekretionsassay und der intrazellulären Zytokinfärbung gemessen.

3 Ergebnisse

3.1 Adenovirus-spezifische T-Zellen bei gesunden Spendern

Es wurden im Zeitraum von Mai 2002 bis September 2003 Blutproben von 41 gesunden Spendern im Alter von 9 bis 55 Jahren auf Adenovirus-spezifische T-Zellen (in %) untersucht.

Die Spanne der gemessenen Werte der spezifischen CD3⁺ T-Zellen aller Probanden reichte von 0% bis 1,41%, Mittelwert: 0,32% \pm 0,35 Standardabweichung.

Bei CD8⁺ T-Zellen lag der Mittelwert bei 0,14% \pm 0,15, wobei die Werte von 0% bis 0,5% variierten. Bei 3 Probanden waren keine spezifischen CD8⁺ T-Zellen nachweisbar.

Der Mittelwert der CD4⁺ T-Zellen lag bei 0,19% \pm 0,24, bei Werten zwischen 0% und 1,04%. Bei 5/36 Probanden konnten keine spezifischen CD4⁺ T-Zellen gefunden werden,

Die im Durchflußzytometer gemessene Verteilung der Lymphozytenpopulationen bei gesunden Spendern ist in Abbildung 2 dargestellt.

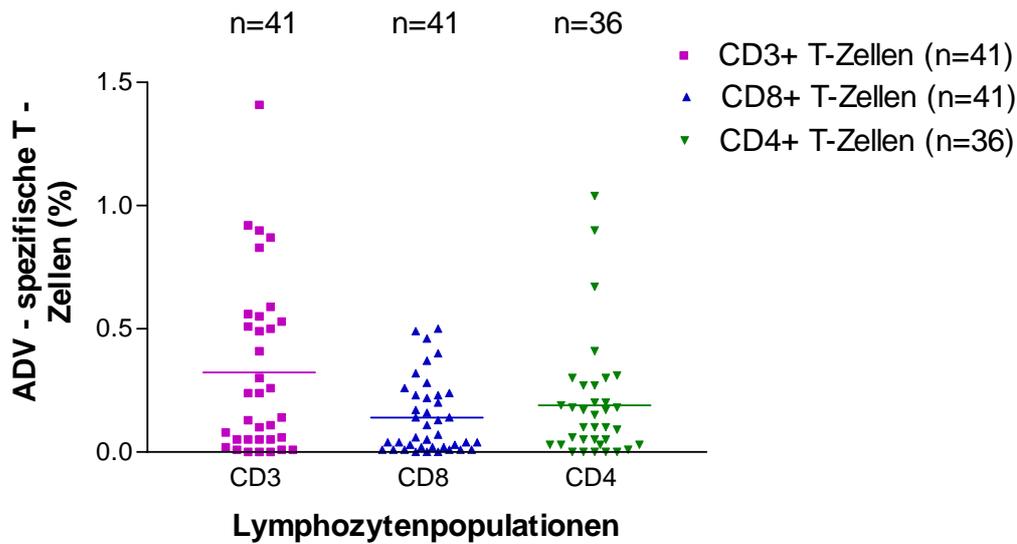


Abbildung 2: Bei gesunden Spendern konnten Adenovirus-spezifische T-Zellen durchflußzytometrisch nach Stimulation ex-vivo mit Adenoviruslast dargestellt werden. In diesem Schaubild sind CD3+, CD4+ und CD8+ T-Zellen auf der x-Achse gegen Adenovirus-spezifische T-Zellen. Durch das gesetzte Gate im Durchflußzytometer wurden ausschließlich CD3⁺ T-Zellen ausgewertet, CD4⁺-und CD8⁺ T- Zellen sind also ebenfalls CD3⁺, da sie aus diesem Kollektiv stammen.

Legende: CD3, CD4, CD8= positive Adenovirus-spezifische T-Zellen in %
n= Anzahl der Messungen

3.2 Adenovirus-spezifische T-Zellen bei Patienten vor Transplantation

Bei 6 Patienten konnten einmalig durchschnittlich 37,3 Tage vor Stammzelltransplantation adenovirus-spezifische T-Zellen gemessen werden. (Abb.3) Der Mittelwert der CD3⁺-Lymphozytenpopulation lag bei 0,103% ± 0,14, leicht höher als bei CD4⁺ T-Zellen mit 0,1% ± 0,084. Der Mittelwert der CD8⁺ T-Zellen-Population liegt am niedrigsten bei 0,09% ± 0,124.

Die gemessenen Werte reichen bei CD3⁺ T-Zellen von 0% bis 0,38%, wobei bei 2 Patienten keine Zellen nachgewiesen werden konnten, bei CD8⁺ T-Zellen von 0% bis 0,25% (n=1) war ein Ergebnis CD8⁻ und bei CD4⁺ T-Zellen mit einer Meßspanne von 0% bis 0,29% (n=3) waren Messungen CD4⁻ gemessen.

Der Patient, bei dem die Messung der CD8⁺ T-Zellen negativ war, hatte CD3⁺ – und CD4⁺–spezifische T-Zellen.

Bei der Messung im Durchflußzytometer wurde wie in 3.1 das Gate auf ausschließlich CD3⁺ T-Zellen gesetzt, die Messwerte der CD4⁺ – und CD8⁺ T-Zellen sind also gleichzeitig CD3⁺, da sie aus diesem Kollektiv stammen.

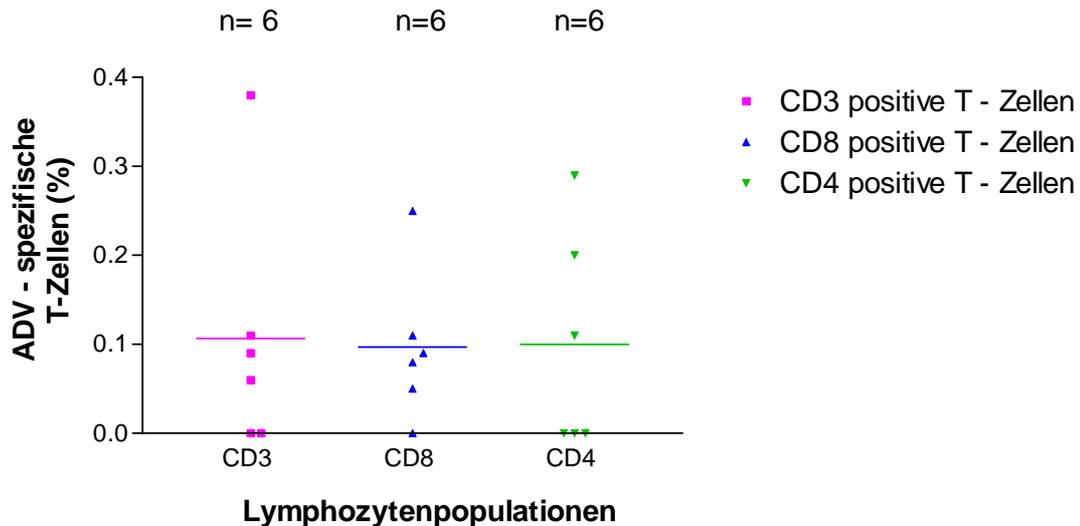


Abbildung 3: Bei diesen 6 Patienten, die vor Stammzelltransplantation untersucht wurden, konnten Adenovirus-spezifische T-Zellen durchflußzytometrisch erfaßt werden. Diese Abbildung zeigt auf der x-Achse die Lymphozytenpopulationen CD3+, CD4+ und CD8+-T- Zellen und auf der y Achse Adenovirus-spezifische T-Zellen in % der Gesamt-T-Zellen.

Legende: CD3, CD4, CD8= positive Adenovirus-spezifische T-Zellen in %
 ADV = Adenovirus
 n= Anzahl der Messungen

3.3 Vergleich der beiden Messmethoden: Intrazelluläre Zytokinfärbung mit dem Zytokin-Sekretionsassay

Die beiden Methoden zur durchflußzytometrischen Bestimmung einer Antigen-spezifischen INF- γ Antwort von T-Zellen, Zytokin-Sekretionsassay und die intrazelluläre Zytokinfärbung, wurden durch 13 Vergleichsmessungen sowohl von gesunden Probanden als auch von Patienten miteinander verglichen.

Der Wert der Zytokin-Sekretionsassay-Meßmethode lag, bezogen auf die jeweilige Lymphozytenpopulation im Vergleich zu der intrazellulären Zytokinfärbung, höher (Abb.4), d.h. sie weist eine höhere Frequenz Adenovirus-spezifischer T-Zellen auf als die Zytokinfärbung.

Bei dem Vergleich des Zytokin-Sekretionsassay-Mittelwertes der CD3⁺ T-Zellen von 0,447% \pm 0,53 lag der Mittelwert der intrazellulären Zytokinfärbung bei 0,176% \pm 0,23. Die Werte der CD3⁺-Zytokin-Sekretionsassay-Messung reichten von 0% bis 1,63%, die Werte der intrazellulären Zytokinfärbung lagen zwischen 0% und 0,7%.

Der Mittelwert der CD8⁺ T-Zellen im Zytokin-Sekretionsassay lag bei 0,325% \pm 0,46, der Mittelwert der intrazellulären gefärbten Zytokine betrug 0,09% \pm 0,15. Bei der Messung der CD8⁺ T-Zellen mit Hilfe des Zytokin-Sekretionsassay variierten die Meßwerte von 0% bis 1,69%, im Vergleich dazu bei der intrazellulären Zytokinfärbung von 0% bis 0,54%.

Bei der Messung der CD4⁺-Lymphozytenpopulationen liegt der Zytokin-Sekretionsassay-Wert bei 0,243% \pm 0,47, wohingegen der Mittelwert der intrazellulären Zytokinfärbung bei 0,117% liegt \pm 0,24. Die Messung der CD4⁺ T-Zellen durch den Zytokin-Sekretionsassay nahm Werte an zwischen 0% und 1,6%, bei der intrazellulären Zytokinfärbung-Messung erreichten die Werte eine Höhe von zwischen 0% und 0,34%.

Bei allen 3 Paarungen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

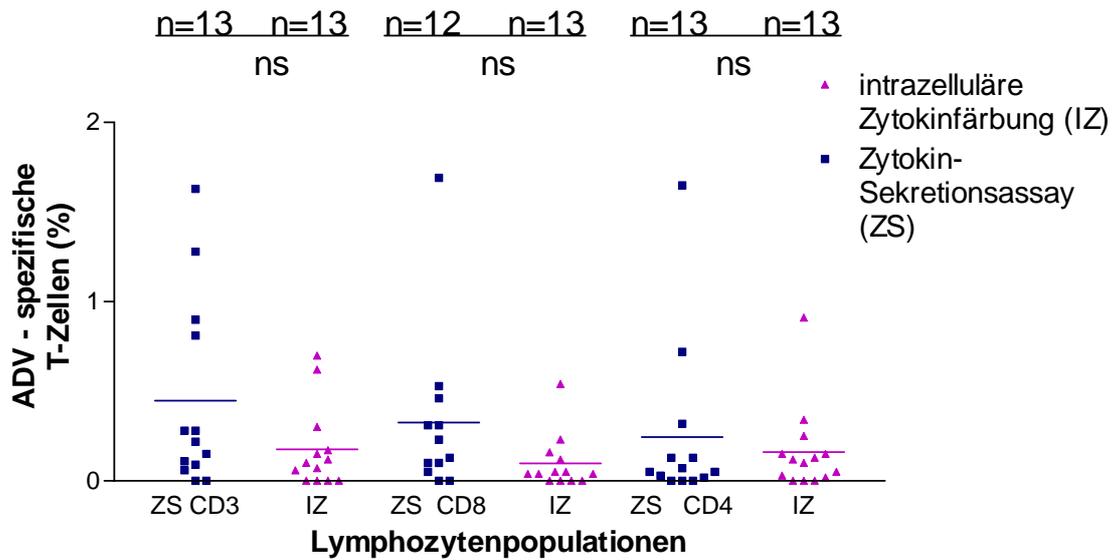


Abbildung 4: Vergleich der beiden Bearbeitungsmethoden Zytokin-Sekretionsassay und intrazelluläre Zytokinfärbung, jeweils gegen die Adenovirus-spezifischen T-Zellen in % auf der y-Achse aufgetragen. Es geht daraus hervor, daß die Bearbeitungsmethode des Zytokin-Sekretionsassay durchweg eine nicht signifikante höhere Frequenz Adenovirus-spezifischer T-Zellen aufweist als die damit verglichene intrazelluläre Zytokinfärbung.

Legende: ZS: Zytokin-Sekretionsassay = Bearbeitungsmethode, s.Teil 2

IZ: intrazelluläre Zytokinfärbung = Bearbeitungsmethode, s.Teil 2

ADV = Adenovirus

Ns = nicht signifikant im Wilcoxon matched pairs test

n= Anzahl der Messungen

CD3, CD4, CD8= positive Adenovirus-spezifische T-Zellen in %

Regeneration der Adenovirus-spezifischen T-Zellen von 4 einzelnen Patienten nach Stammzelltransplantation

Es wurde die Immunrekonstitution der Adenovirus-spezifischen T-Zellen in % und absolut im Vergleich bei 4 Patienten betrachtet. (Abb.5)

Patient 1 ist 10 Jahre alt, Patient 2 ist 1,3 Jahre alt. Beide wurden mit Knochenmark von einem HLA- identischen Fremdspender transplantiert.

Patient 3 wurde mit einem Transplantat aus selektionierten Stammzellen von einem HLA- identischen Fremdspender transplantiert und ist zum Zeitpunkt der Stammzelltransplantation ist 22,75 Jahre alt.

Patient 4 ist 18,28 Jahre alt. Er wurde durch einen haploidentischen Familienspender mit selektionierten Stammzellen transplantiert.

Man sieht einen deutlichen Anstieg der CD3-, CD4- und CD8-positiven T-Zellen bei allen 4 Patienten über die Zeit nach Transplantation aufgetragen, sowohl bei den % Adenovirus-spezifischen Zellen als auch bei den Absolutwerten.

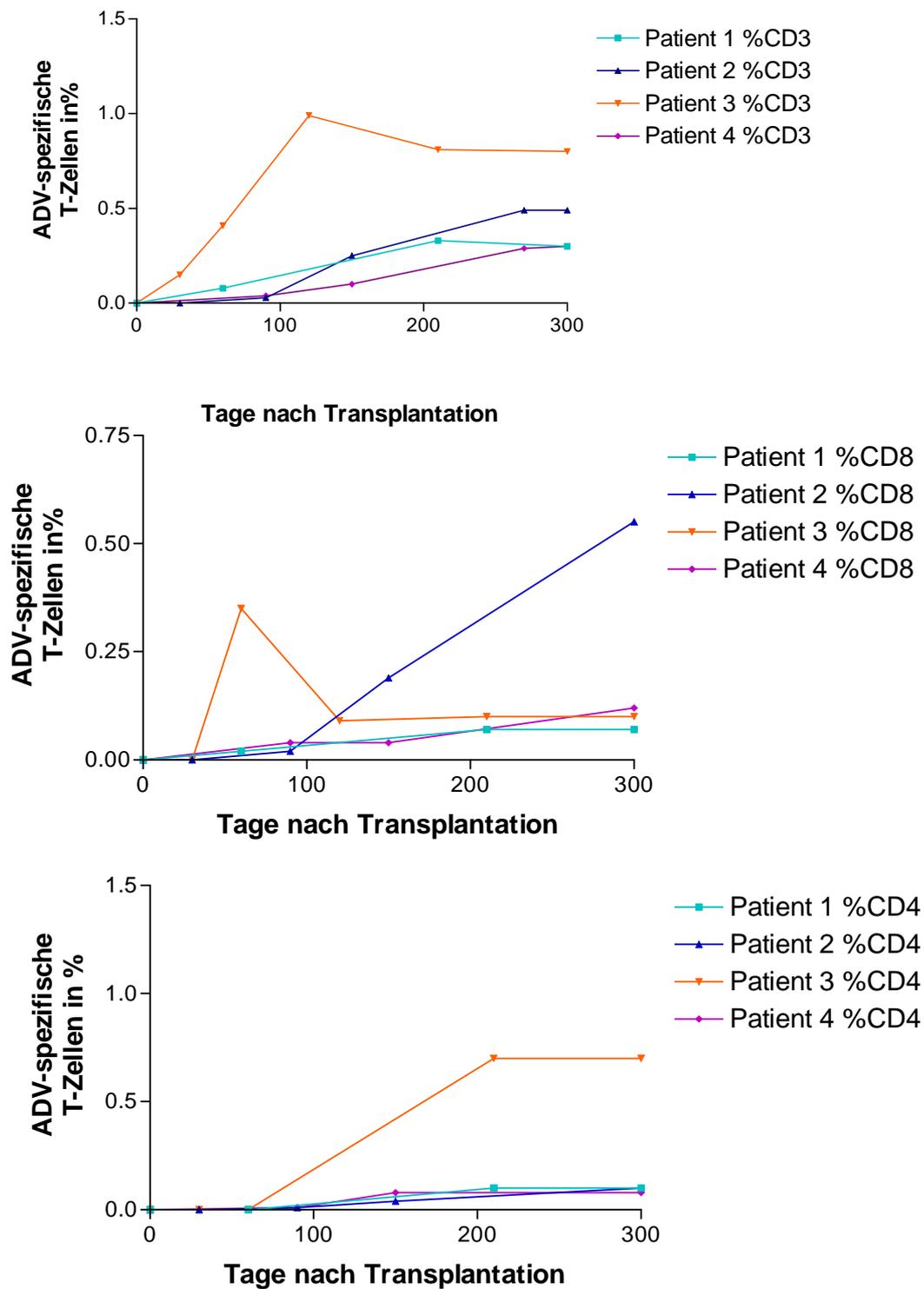


Abbildung 5: Der Verlauf der Immunrekonstitution der Adenovirus-spezifischen T-Zellen bei 4 Patienten. Es ist hier der Prozentsatz der Adenovirus-spezifischen-Zellen dargestellt.

Legende: CD3,CD4,CD8 = CD3, CD4, CD8 positive ADV spezifische T-Zellen in %

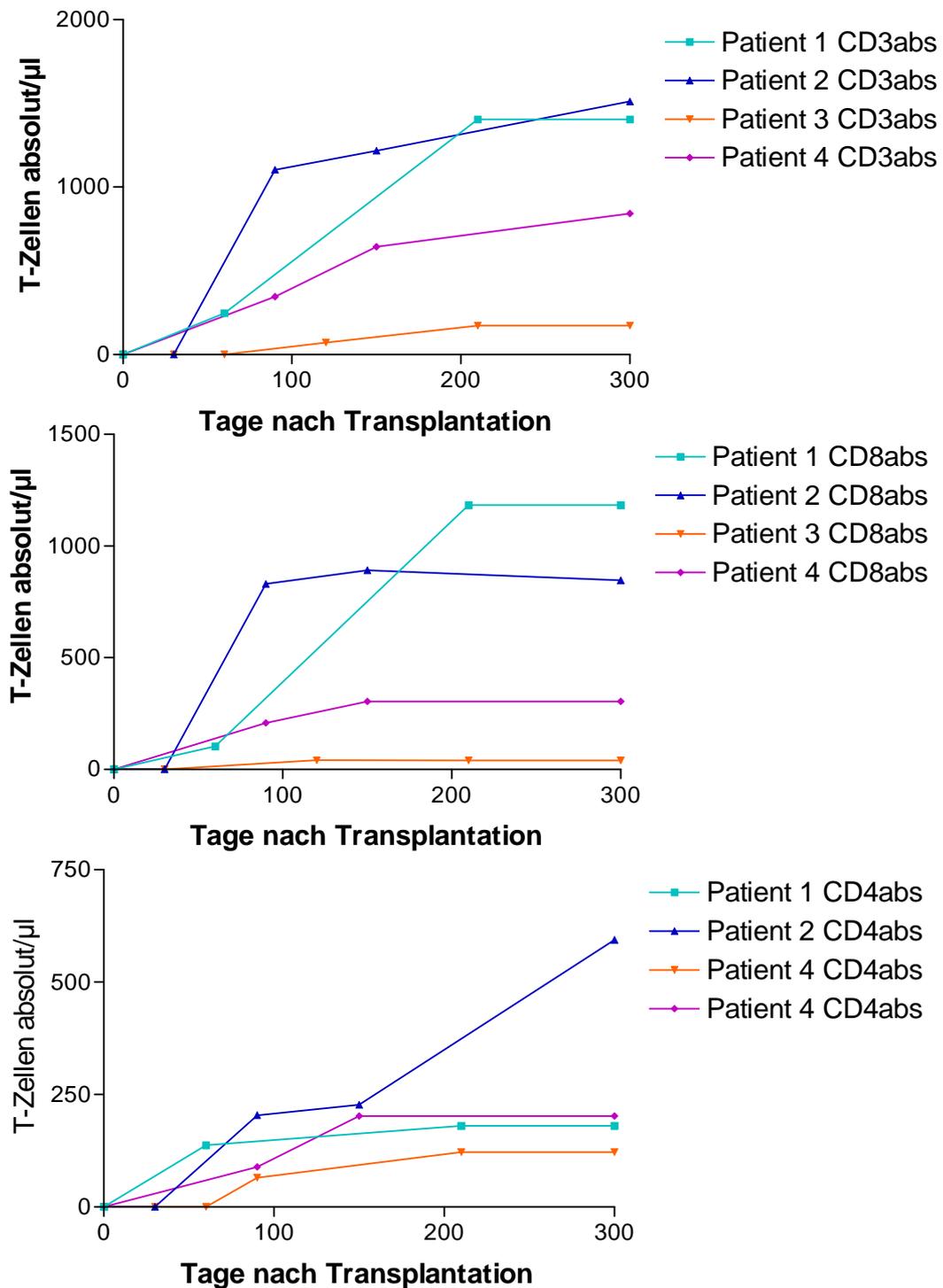


Abbildung 6: Der Verlauf der Immunrekonstitution CD3 positiver T-Zellen bei 4 Patienten. Hier wurde die absolute Zahl der Adenovirus-spezifischen T-Zellen dargestellt.

Legende: CD3,CD4,CD8 = CD3, CD4, CD8 positive ADV spezifische T-Zellen in %

3.4 Regeneration Adenovirus-spezifischer T-Zellen bei allen Patienten nach Stammzelltransplantation

Es wurden im Zeitraum von Januar 2002 bis September 2003 alle Patienten nach Stammzelltransplantation auf die Immunrekonstitution CD3⁺-, CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen untersucht. Insgesamt wurden (n=118) Proben von 53 Patienten im Alter zwischen 3 Monaten und 19 Jahren gemessen.

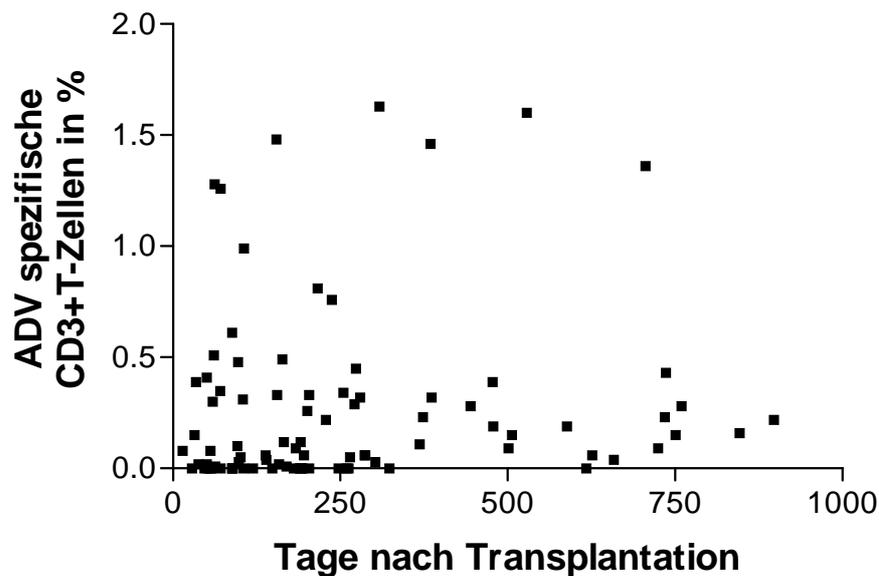


Abbildung 7: Auswertung der einzelnen Messpunkte. Die Tage nach Transplantation auf der x-Achse sind gegen die % Adenovirus spezifischen-T-Zellen aufgetragen.

Die Auswertung der Messungen wurde auf die Tage < 60, 100, 200, 365 und >365 nach Transplantation gebündelt.

Es wurde eine deutlich ansteigende Entwicklungstendenz der Adenovirus-spezifischen T-Zellen im Laufe des ersten Jahres und darüber hinaus deutlich (Abb 3.5). Alle Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tab.1 dargestellt.

Die Immunrekonstitution der CD3⁺-T-Helferpopulationen begann ab Tag 60 (Mittelwert: 0,087% ± 0,14) und Tag 100 nach der Stammzelltransplantation und stieg an über 0,233% nach einem Jahr auf einen Mittelwert von 0,387% ± 0,48 nach über einem Jahr.

Der Verlauf der Rekonstitution Adenovirusspezifischer CD8⁺ T-Zellen begann ab Tag 60 (Mittelwert 0,06 ± 0,14) und Tag 100 (Mittelwert 0,19%) und stieg kontinuierlich an auf 0,317% ± einer Standardabweichung von 0,49 nach einem Jahr.

Die Immunrekonstitution der CD4⁺-T-Zellen begann ebenso ab Tag 60 bei einem Mittelwert von 0,10% ± 0,13 und konnte nach über einem Jahr einen Mittelwert von 0,15% erreichen ± 0,15.

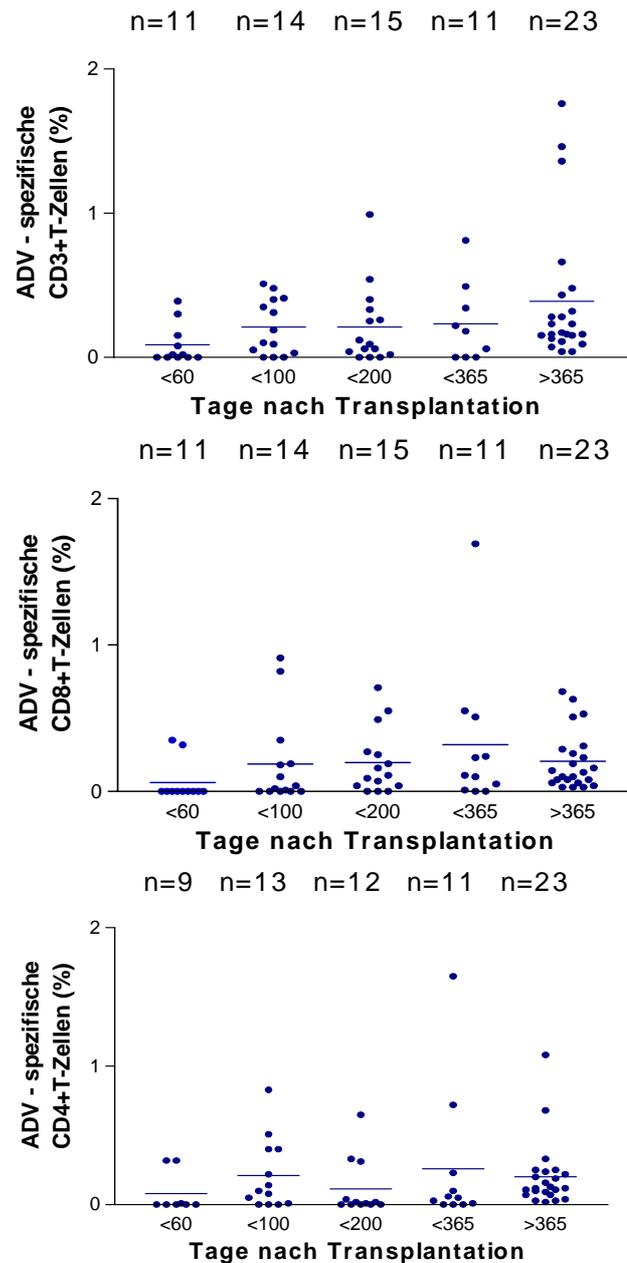


Abbildung 8: Verlauf der Regeneration Adenovirus-spezifischer T-Zellen nach Transplantation bei allen 53 untersuchten Patienten nach Stammzelltransplantation. Es sind jeweils die detektierten Adenovirus-spezifischen T-Zellen in % auf der y-Achse gegen die Zeit in Tagen auf der x-Achse aufgetragen. Eine Unterteilung in CD3-, CD4- und CD8 positive Zellen wurde vorgenommen.

Legende: n= Anzahl der Messungen

CD3/4/8 = Adenovirus spezifische Lymphozytenpopulationen in %

ADV = Adenovirus

Tabelle 6: Mittelwerte und Standardabweichungen der CD3+-, CD8+- und CD4+- T-Zellen im Verlauf nach Stammzelltransplantation

		n	<60Tage	<100Tage	<200Tage	<365Tage	>365Tage
CD3⁺	Mittelwert in%	67	0,087	0,21	0,21	0,23	0,39
CD3⁺	Standardabw		0,14	0,19	0,27	0,27	0,48
CD8⁺	Mittelwert in%	67	0,06	0,19	0,20	0,32	0,21
CD8⁺	Standardabw		0,14	0,31	0,22	0,49	0,20
CD4⁺	Mittelwert in%	63	0,10	0,25	0,15	0,03	0,15
CD4⁺	Standardabw		0,13	0,28	0,23	0,04	0,15

Legende: n= Anzahl der Messungen

Alle Werte haben die Einheit: Adenovirus spezifische T-Zellen in %

3.5 Regeneration der Adenovirus-spezifischen CD3+ T-Zellen bei Patienten nach Stammzelltransplantation im Vergleich zu gesunden Spendern

Die Einteilung nach einer Adenovirus-spezifischen T-Zell-Anzahl von kleiner oder größer 0,2% erfolgte aufgrund folgender Messungen und Beobachtungen: Bei gesunden Spendern lagen 50% der Messungen über, 50 % unter dem Wert von 0,2% Adenovirus-spezifischer T-Zellen. Es macht also Sinn, diesen Wert als Aufteilungskriterium in 2 Gruppen bei den Messungen von Patienten heranzuziehen, schon alleine um eine Daten-Vergleichbarkeit herzustellen.

Man sieht außerdem an den Mittelwerten aus Tabelle 6, daß nach 200 Tagen sowohl die Mittelwerte der CD3 als auch der CD8 positiven Adenovirus - spezifischen T-Zellen sehr genau bei der Aufteilung kleiner/größer 0,2% liegen.

Der Vergleich zwischen der Regeneration der stammzelltransplantierten Patienten und der Höhe der Werte für Adenovirus-spezifische T-Zellen bei gesunden Spendern, ist in Abb.9 dargestellt.

Es fällt eine Steigerung der Regeneration der Adenovirus-spezifischen T-Zellen für den Zeitraum >Tag 200 nach Stammzelltransplantation auf und verglichen mit den Messwerten gesunder Spender eine Wiederannäherung der Zahl der CD3 positiven T-Zellen an die Normalwerte.

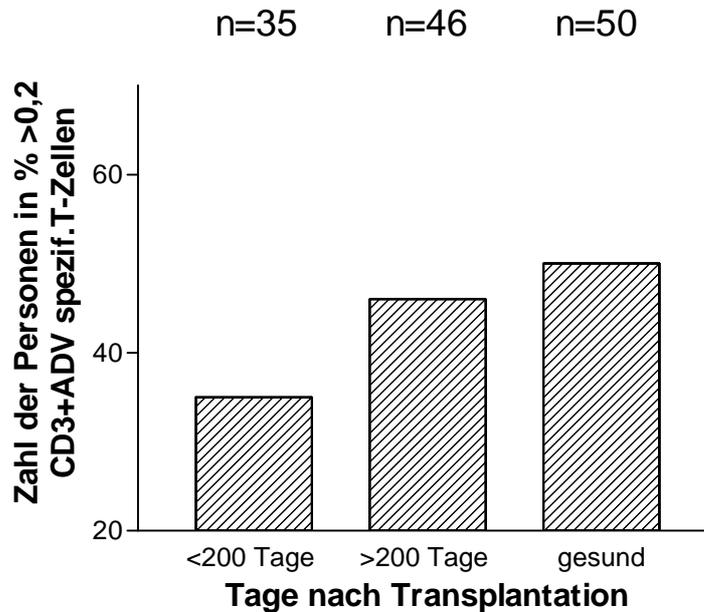


Abbildung 9: CD3 positive Adenovirus-spezifischen T-Zellen von gesunden Spendern im Vergleich zu Patienten nach Stammzelltransplantation dargestellt. Es wurden Messungen zusammengenommen, die bis zum Tag 200 gemacht wurden und nach Tag 200 nach Stammzelltransplantation. Dabei sind die Zahl der gemessenen Personen, die einen Adenovirus spezifischen CD3 positiven T-Zell-Wert von > 0,2% hatten auf der y-Achse aufgetragen, auf der x-Achse stehen die Tage nach Stammzelltransplantation.

Legende: n= Anzahl der Messungen in %

Es wurden Messungen zusammengenommen, die bis zum Tag 200 gemacht wurden und nach Tag 200 nach Stammzelltransplantation.

Um noch einmal deutlich zu machen, wie sich die Regeneration der Adenovirus-spezifischen T-Zellen der Patienten im Vergleich zu den gesunden Spendern verhält, wurde die folgende Graphik erstellt. Im Diagramm ist der Zeitabstand auf der y-Achse nach Transplantation aufgetragen gegen den prozentualen Anteil an Patienten, die die Schwelle von 0,2% Adenovirus-

spezifischer CD3 positiver T-Zellen überschritten haben. Es handelt sich um die Meßwerte von >30 Patienten.

Man sieht hierbei, daß nach ca. einem Jahr nach Transplantation der Meßwert der Regeneration der T-Zellen nahezu dem Wert gesunder Spender entspricht. Die Einteilung in die Gruppe >0,2% CD3 positive T-Zellen basiert auf der Beobachtung, daß sich bei neu Transplantierten überwiegend Werte <0,2% messen lassen und nur sehr wenige dieser Patienten diesen Wert von 0,2% überschreiten.

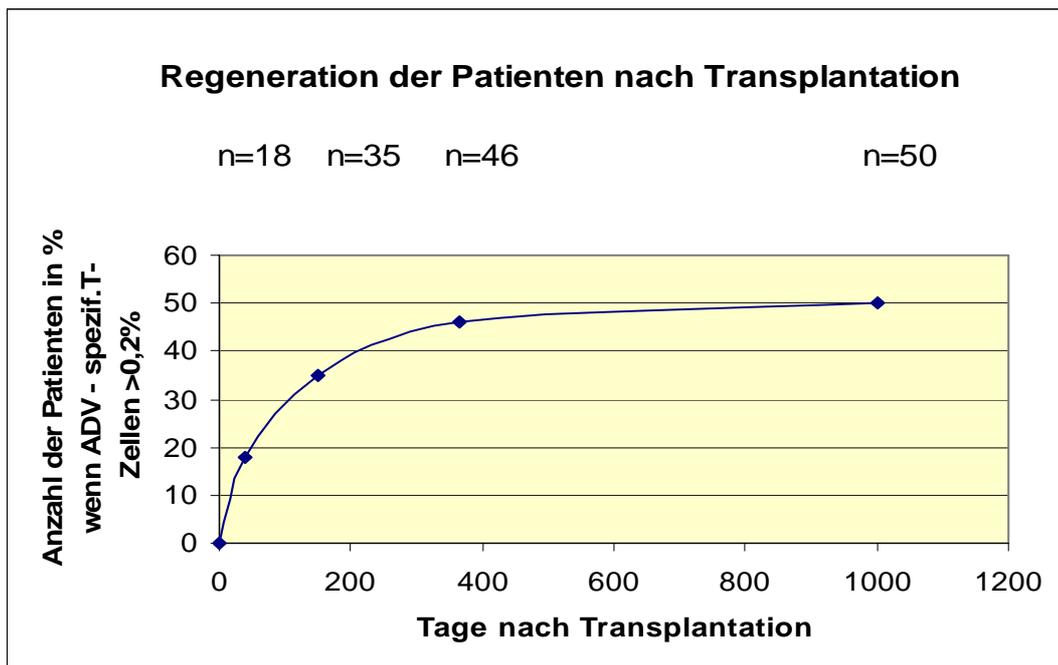


Abbildung 10: Prozentsatz der Patienten im Zeitabstand zur Transplantation wie viele Patienten prozentual die Schwelle von 0,2% Adenovirus-spezifischer CD3 positiver T-Zellen überschreiten. Es handelt sich um die Messwerte von >30 Patienten.

Legende: ADV = Adenovirus

n= Anzahl der Messungen

Um die Entwicklungstendenz der Adenovirus-spezifischen T-Zellen in Abhängigkeit von Spendern und Transplantaten vergleichen zu können, wurden 2 Untergruppen gebildet und getrennt voneinander ausgewertet.

3.6 Adenovirus-spezifische T-Zell-Regeneration nach haplo-identischer, Geschwister-oder Fremdspendertransplantation

Es wurde die CD3-/ CD8-/ CD4-Adenovirus-spezifische T-Zell-Regeneration (in Prozent) nach Stammzelltransplantation in Abhängigkeit von der Art der Spender untersucht (Abb.11). Die Gruppierungen sind: HLA-identische Geschwisterspender (=sib), HLA-identische Fremdspender (=MUD) und haploidentische Familienspender (Vater, Mutter, = haplo),

Die im Durchflußzytometer gemessenen Werte wurden eingeteilt in <100 Tage, <ein Jahr und >1Jahr nach Stammzelltransplantation (Tab.7).

Die Anzahl der gemessenen Patienten mit Transplantation durch haploidentische Familienspender beträgt 8, von HLA-identischen Fremdspendern wurden 30 und von HLA-identischen Geschwisterspendern 13 untersucht.

Die Entwicklung der Adenovirus-spezifischen CD3⁺ T-Zellen nach Transplantation durch haploidentische Familienspender war deutlich ansteigend, ausgehend von einem Mittelwert von 0,091% nach 100 Tagen bis zu einem Mittelwert von 0,36% ± 0,4 (Tab.7)

Die Rekonstitution spezifischer CD3⁺ T-Zellen begann bis zum Tag 100 nach Transplantation mit HLA-identische Fremdspender liegt der Mittelwert nach 100 Tagen bei 0,28% und nach über einem Jahr bei 0,22% ± 0,21.

Bei HLA-identischen Geschwisterspendern war der Verlauf der Rekonstitution der Adenovirus-spezifischen CD3⁺ T-Zellen zunehmend von 0,21% nach 100 Tagen zu einem Mittelwert von 0,414% nach über einem Jahr ± 0,31.

Die Regeneration der Adenovirus-spezifischen CD4⁺ T-Zellen begann bei den Familien von haploidentische Fremdspender transplantierten Patienten nach den ersten 100 Tagen mit einem Mittelwert von 0,045%, der dann nach über einem Jahr auf 0,2% ± 0,29 Adenovirus – spezifischer CD4⁺ T-Zellen anstieg.

Bei HLA-identischen Fremdspendern stieg dieser Mittelwert im Verlauf eines Jahres von 0,14% nach den ersten 100 Tagen auf 0,174% ± 0,12 nach über 1 Jahr.

Bei der Untersuchung der durch HLA-identische Geschwisterspender transplantierten Patienten wurde nach 100 Tagen ein Mittelwert der Adenovirus-spezifischen CD4⁺ T-Zellen von 0,135% gemessen, nach über einem Jahr stieg der Mittelwert auf 0,188% ± 0,19 an.

Bei der Untersuchung der Adenovirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen verhielt sich die Immunrekonstitution in ähnlich ansteigender Tendenz. Der gemessene Mittelwert nach 100 Tagen bei Patienten, die von haploidentische Familienspender transplantiert wurden, lag bei 0,008%. Er erreichte nach über einem Jahr 0,135% ± 0,18.

Nach Transplantation von HLA-identische Fremdspender stieg der Mittelwert der Adenovirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen von 0,199% nach den ersten 100 Tagen und lag nach über einem Jahr durchschnittlich bei 0,13% ± 0,1.

Die Rekonstitution der durch HLA-identische Geschwisterspender transplantierten Patienten zeigte einen leicht zunehmenden Verlauf, der Mittelwert nach 100 Tagen lag bei 0,252% und nahm nach über einem Jahr bis auf 0,275% ± 0,17 zu.

Man kann insgesamt eine deutlich ansteigende Entwicklung der Adenovirus-spezifischen T-Zellen feststellen.

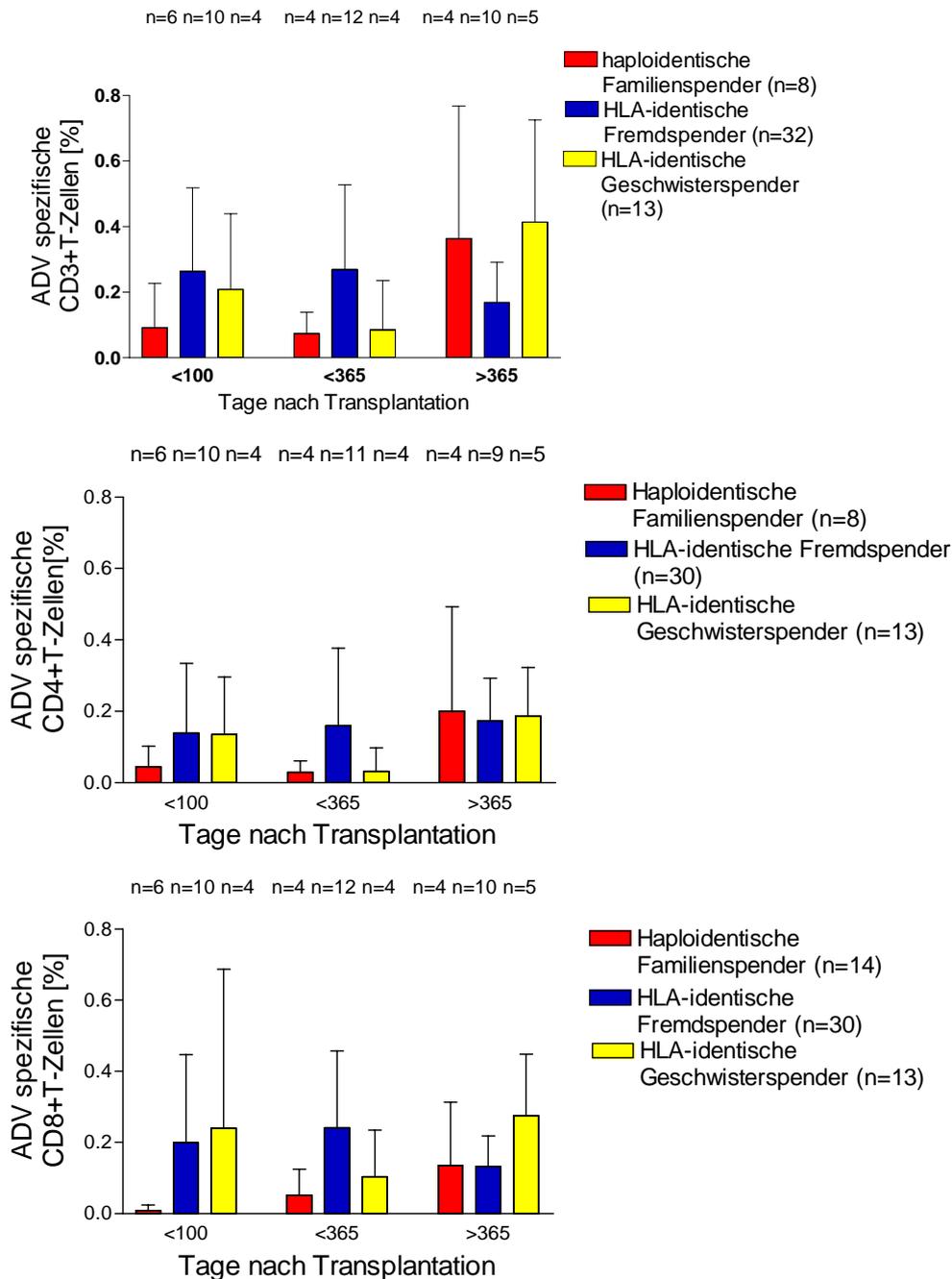


Abbildung 11: Adenovirus- CD3 spezifische Regeneration nach Stammzelltransplantation in Abhängigkeit des Spenders, die Adenovirus-spezifischen T-Zellen sind auf der y-Achse gegen die Tage nach Stammzelltransplantation aufgetragen

Legende: haplo = haploidentische Familienspender (Mutter, Vater)

n = Anzahl der Messungen

ADV = Adenovirus, spezifische T-Zellen sind in % gemessen

Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichungen der Absolutwerte der vom Spender abhängigen Untergruppen im Verlauf

			n (Anzahl)	<100 Tage	<365 Tage	>365 Tage
CD3	haplo	Mittelwert	8	0,09	0,07	0,36
		Standardabw (in%)				
	MUD	Mittelwert	32	0,28	0,25	0,22
		Standardabw (in%)				
	sib	Mittelwert	13	0,21	0,09	0,41
		Standardabw (in%)				
CD8	Haplo	Mittelwert	14	0,01	0,05	0,14
		Standardabw (in%)				
	MUD	Mittelwert	30	0,26	0,23	0,15
		Standardabw (in%)				
	Sib	Mittelwert	13	0,24	0,10	0,28
		Standardabw (in%)				
CD4	Haplo	Mittelwert	8	0,05	0,03	0,20
		Standardabw (in%)				
	MUD	Mittelwert	30	0,14	0,16	0,17
		Standardabw (in%)				
	sib	Mittelwert	13	0,14	0,03	0,19
		Standardabw (in%)				

Legende: CD3, CD8, CD4 = CD3, CD8, CD4 positive Adenovirus spezifische T-Zellen in %

n= Anzahl der Messungen

Haplo= haploidentische Familienspender

MUD= matched unrelated donor, HLA-identische Fremdspender

Sib= HLA-identische Geschwisterspender

Standardabw= Standardabweichung: Einheit in %

3.7 Vergleich von Patientengruppen, die mit unselektioniertem Knochenmark, selektionierten Stammzellen aus Leukoapheresat und zusätzlichen T-Zellgaben transplantiert wurden

Es wurde die Regeneration der Adenovirus-spezifischen CD3⁺-/CD8⁺-/CD4⁺- T-Zellen (in Prozent) nach Stammzelltransplantation in Abhängigkeit von der Art des Transplantates untersucht (Abb.12), also ob die Patienten mit unselektioniertem Knochenmark (KM), mit selektionierten Stammzellen aus Leukoapheresat (CD34) oder zusätzlich zu CD34 selektionierten Stammzellen T-Zellgaben von $> 10^6$ / kg Körpergewicht transplantiert wurden.

Die im Durchflußzytometer gemessenen Werte wurden nach dem Einteilungskriterium <100 Tage, $<$ ein Jahr und >1 Jahr nach Transplantation zusammengefaßt (Tab.8).

Hierbei wurden Patienten gemessen, von denen 21 ein Transplantat aus selektionierten Stammzellen bekommen hatten, 24 Patienten hatten ein Transplantat, das zusätzlich mit T-Zellen angereichert worden war und weitere 23 Patienten hatten unselektioniertes Knochenmark infundiert bekommen.

Bei den Patienten, die ein Transplantat mit selektionierten Stammzellen (CD34) aus Leukoapheresat bekamen, zeigte die Immunrestitution nach Transplantation einen ansteigenden Verlauf, ein Mittelwert der Adenovirus-spezifischen CD3⁺-T-Zellen von 0,173% wurde nach 100 Tagen gemessen, der dann im Laufe des ersten Jahres auf $0,465\% \pm 0,44$ stieg (Absolutwerte siehe Tab.3).

Die Patienten, die zusätzlich zu CD34 selektionierten Stammzellen T-Zellgaben (CD34+T) erhielten, hatten nach 100 Tagen einen Mittelwert der spezifischen T-Zellen von 0,238%, der dann kontinuierlich zunahm und nach einem Jahr bei $0,428\% \pm 0,64$.

Bei den Patienten, deren Transplantat unselektioniertes Knochenmark (KM) war, wurde ein zunehmender Verlauf der CD3⁺ T-Zellen festgestellt. Der Mittelwert von 0,03 % nach 100 Tagen stieg auf 0,17% nach einem Jahr $\pm 0,19$.

Bei der Regeneration der CD8⁺ T-Zellen ergibt sich bei Betrachtung der selektionierten Stammzellen (CD34) in den ersten 100 Tagen ein Mittelwert von 0,175%, der nach einem Jahr bei $0,058\% \pm 0,05$ liegt.

Bei den Patienten, deren Transplantat zusätzlich mit T-Zellen angereichert wurde (CD34+T), stieg der Mittelwert der Adenovirus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen 100 Tage nach Transplantation an, er lag bei 0,16% und erreichte nach einem Jahr $0,366\% \pm 0,49$.

Die Entwicklung der CD8⁺ T-Zellen nach Transplantation mit unselektioniertem Knochenmark (KM) war zunehmend, der Mittelwert befand sich nach 100 Tagen bei 0,134%, nach dem ersten Jahr bei $0,266\% \pm 0,27$.

Angefangen mit Patienten, die das mit selektionierten Stammzellen (CD34) angereicherte Transplantat bekamen, lag der Mittelwert der Adenovirus-spezifischen CD4⁺ T-Zellen nach den ersten 100 Tage bei 0,155%, der nach dem ersten Jahr auf 0,25% anstieg.

Bei Patienten, deren Transplantat zusätzlich mit T-Zellen angereichert worden war (CD34+T), war der Verlauf der CD4⁺ T-Zellen ebenfalls leicht ansteigend. Gemessen wurde nach den ersten 100 Tagen nach der Transplantation ein Adenovirus-spezifischer Mittelwert der T-Zellen von 0,234%, nach einem Jahr war dieser $0,244\% \pm 0,47$.

Der Mittelwert der CD4⁺ T-Zellen bei Patienten, die unselektioniertes Knochenmark (KM) transplantiert bekommen hatten, war nach 100 Tagen 0,193% und lag nach einem Jahr bei $0,028\% \pm 0,04$.

Man kann insgesamt eine ansteigende Entwicklung der Adenovirus-spezifischen T-Zellen feststellen.

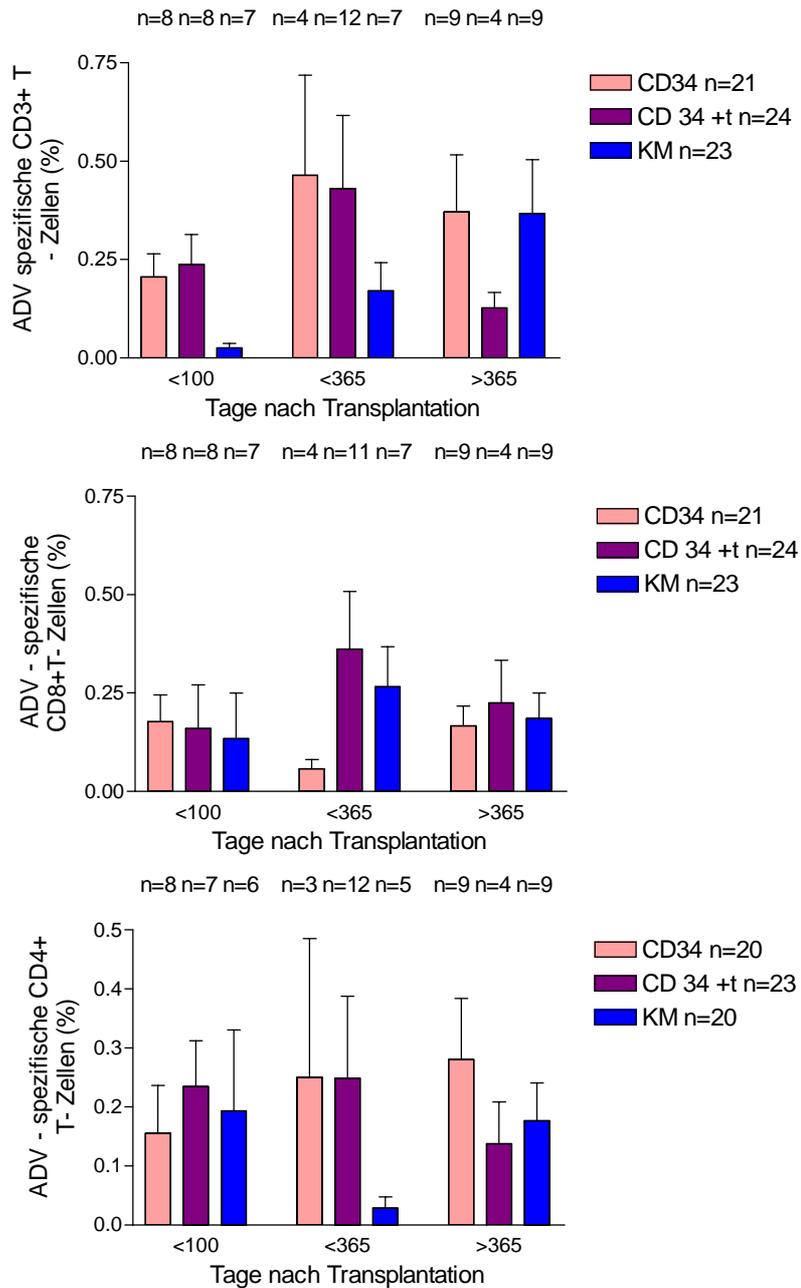


Abbildung 12: CD3 spezifische Regeneration nach Stammzelltransplantation in Abhängigkeit des Transplantates dargestellt, die Adenovirus-spezifischen T-Zellen sind auf der y-Achse aufgetragen gegen die Tage nach Stammzelltransplantation.

Legende: CD34 = Transplantat aus selektionierten Stammzellen aus Leukoapheresat
 CD34+T= zusätzliche Anreicherung zu CD34 selektionierten Stammzellen mit T-Zellen

KM = Transplantat aus unselektioniertem Knochenmark

Alle Werte beziehen sich auf Adenovirus-spezifische T-Zellen in %

Tabelle 8: Mittelwerte und Standardabweichung der vom Transplantat abhängigen Untergruppe im Verlauf

		n(Anzahl)	<100Tage	<365Tage	>365Tage	
CD3	CD34	Mittelwert	21	0,21	0,47	0,37
		Standardabw (in%)		0,17	0,51	0,44
	CD34+T	Mittelwert	24	0,24	0,43	0,13
		Standardabw (in%)		0,22	0,64	0,08
	KM	Mittelwert	23	0,03	0,17	0,37
		Standardabw (in%)		0,03	0,19	0,41
CD8	CD34	Mittelwert	21	0,18	0,06	0,17
		Standardabw (in%)		0,19	0,05	0,15
	CD34+T	Mittelwert	24	0,16	0,36	0,23
		Standardabw (in%)		0,31	0,49	0,22
	KM	Mittelwert	23	0,13	0,27	0,19
		Standardabw (in%)		0,30	0,27	0,19
CD4	CD34	Mittelwert	20	0,16	0,25	0,28
		Standardabw (in%)		0,23	0,47	0,31
	CD34+T	Mittelwert	23	0,23	0,23	0,14
		Standardabw (in%)		0,21	0,47	0,14
	KM	Mittelwert	20	0,19	0,03	0,18
		Standardabw (in%)		0,34	0,04	0,19

Legende: CD34 = Transplantat aus selektionierten Stammzellen aus Leukoapheresat, Werte in % Adenovirus spezifische positive T-Zellen
 CD34+T= zusätzliche Anreicherung zu CD34 selektionierten Stammzellen mit T-Zellen, Werte in % Adenovirus spezifische positive T-Zellen
 KM = Transplantat aus unselektioniertem Knochenmark, Werte in % Adenovirus spezifische positive T-Zellen
 Standardabweichung: Einheit in %
 n= Anzahl der Messungen

4 Diskussion

Die Adenovirusinfektion ist bei pädiatrischen Patienten nach allogener Stammzelltransplantation eine besonders gefürchtete Komplikation, die in den letzten Jahren mehr und mehr an Bedeutung gewinnt.

Im ersten Teil der Arbeit wurden gesunde Spender und Patienten vor Stammzelltransplantation auf Adenovirus-spezifische T-Zellen untersucht, außerdem wurden die beiden Meßmethoden Zytokin-Sekretionsassay und intrazelluläre Zytokinfärbung miteinander verglichen.

Der zweite Teil der Arbeit befaßt sich mit der Regeneration der Adenovirus-spezifischen T-Zellen nach Stammzelltransplantation und der Herausarbeitung ihrer Abhängigkeit von Spendertyp oder von Transplantatmanipulation.

4.1 Methodenkritik

Es handelt sich bei dieser Arbeit um eine prospektive Studie. Vorteil hierbei ist die hohe Datenqualität, nachteilig sind die lange Dauer der Erhebung und ein hoher finanzieller Aufwand.

4.1.1 Die Bearbeitungs- und Nachweisverfahren

Die in dieser Arbeit verwendeten Sekretions-Assays ermöglichen einen Nachweis der Anzahl der Zellen, die ein bestimmtes Zytokin produzieren.

4.1.2 Zytokin-Sekretionsassay

Der Zytokin-Sekretionsassay hat den Vorteil, daß man damit die tatsächlich in den interzellulären Raum sezernierenden Zytokine detektieren kann. Dadurch kann es jedoch auch zum Problem der Kreuzmarkierung kommen. Die Sekretion von Zytokinen wie Interferon γ , Interleukin 4 oder Interleukin 10 wird nach Stimulation mit einem Adenovirus-spezifischen Antigen angeregt. Die CD3-/ CD4- und CD8-positiven Leukozyten werden an ihrer Oberfläche mit

einem sogenannten Catch Reagenz markiert, an welches dann die Zytokine binden. Erfolgt jedoch die Markierung an einer Interferon γ -negativen T-Zelle, wird diese nachher im Durchflußzytometer als positiv gemessen. Es erscheint also ein falsches positives Ergebnis, das auf das Phänomen der methodenbedingten Kreuzkontamination zurückzuführen ist. Der Zytokin-Sekretionsassay hat eine hohe Sensitivität und eine etwas geringere Spezifität.

4.1.3 Die intrazelluläre Zytokinfärbung

Das Verfahren der intrazellulären Zytokinfärbung erfolgt über eine Fixierung und Permeabilisierung der Zellmembran, durch die dann Antikörper zu den intrazellulären Strukturen vordringen können, wodurch eine intrazelluläre Zytokin-Analyse ermöglicht wird. Ist diese Permeabilisierung ungenügend, wird eine ursprünglich Interferon- γ positive T-Zelle als negativ eingestuft und wird dementsprechend nicht erfaßt. Es erscheint also ein falsches negatives Ergebnis. Dieses Verfahren hat eine hohe Spezifität, aber im Falle einer ungenügenden Permeabilisierung eine niedrigere Sensitivität. Aus diesem Grund sind unter anderem Inkubationszeiten genau einzuhalten.

4.1.4 Nachweis Antigen-spezifischer Zellen

Die Durchflußzytometrie ist ein Verfahren, um die Fähigkeit der spezifischen Zytokinsynthese von CD4- und CD8-positiven T-Zell-Untergruppen nachzuweisen.

Neben der Einzelzellanalyse ist die simultane Messung mehrerer Parameter ein weiterer Vorteil dieser Nachweismethode. Darüber hinaus erweitert sich das Spektrum der einsetzbaren Farbstoffe durch die Verwendung mehrerer Laser mit unterschiedlicher Wellenlänge.

Durch die Durchflußzytometrie ist es möglich, eine Quantifizierung, Identifizierung und Charakterisierung der Antigen-spezifischen Gedächtnis- und Effektorzellen vorzunehmen. Sich daraus ergebende weitere Vorteile dieser Methode sind wie schon von Waldrop et al. [14] beschrieben:

- Eine Milderung des negativen Effektes der Apoptose durch die kurze Stimulations- und Inkubationszeit.
- Eine verbesserte Sensitivität durch das effiziente Auffangen und Erfassen der produzierten Zytokine
- Außerdem wird die signifikante Sensitivität gesteigert durch die unabhängige Anzüchtung in Kulturen und der hohen Empfindlichkeit der Fluoreszenz-detektion [14].

Es gibt zwei Möglichkeiten, die das Ergebnis der Messung verfälschen können.

Zum einen sind die Stimulationsbedingungen entscheidend für die Qualität der Messung. Wie schon erwähnt kann es zur Kreuzmarkierung oder zu ungenügenden Permeabilisierung kommen. Desweiteren führt die Stimulation durch andere Stimuli, die eine Interferon-Sekretion auslösen, zu falschen Meßwerten.

Zum anderen dann die Messung selbst. Eine mangelhafte Färbung der Proben während der gesamten Bearbeitung ebenso wie deren Verunreinigung führen zu inkorrekten Messungen. Während der Phase der Durchflußztometrie können sich folgende Probleme ergeben: Wenn der Durchfluß an Zellen pro Sekunde während der Messung zu hoch ist, können dadurch die Zellen quantitativ nicht erfaßt werden. Um dem vorzubeugen, muß das entsprechende Meßfenster (= Gate), wie bereits im Material- und Methodenteil beschrieben auf die zu untersuchenden lebenden Zellen gesetzt werden. Das Ergebnis kann zusätzlich dadurch verfälscht werden, daß die meisten Zellen auch ohne Anfärbung eine gewisse Autofluoreszenz zeigen und daß, wenn keine optischen Zellkulturen vorhanden sind, auch keine Interferon-Sekretion gemessen werden kann.

Aus diesen Gründen muß bei jeder Probe immer eine Kontrolle der Proben durchgeführt werden. Es kann so auch festgelegt werden, ab welcher Fluoreszenzintensität die Zelle als positiv gelten. Nur so kann die Fluoreszenz auf den gebundenen Antikörper und den entsprechenden Farbstoff zurückgeführt werden.

4.2 Gesunde Spender

Um vergleichbare Messungen zu denen der erkrankten und immunsupprimierten Patienten zu haben, wurden 41 Proben gesunder Spender ausgewertet. Die gesunden Probanden befanden sich mehrheitlich im Alter zwischen 9 und 55 Jahren.

Ein Vergleich zeigt, daß die Mittelwerte der Adenovirus-spezifischen CD3 positiven T-Zellen ebenso wie die Mittelwerte der CD8⁺ T-Zellen und die der CD4⁺ T-Zellen bei den gesunden Probanden einen deutlich höheren Wert betragen als bei den Stammzelltransplantierten Patienten.

Dieses Ergebnis steht nicht im Einklang mit dem Artikel von Sester et al. [10], in dem deutlich diskutiert wird, daß trotz Immunsuppression die Höhe der Adenovirus spezifischen T-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen keinen Unterschied aufweist. Sie berichten außerdem, daß eine Abnahme der Adenovirus-spezifischen T-Zellen im Alter ebenso wie eine verminderte INF- γ -Sekretion gemessen wurde.

Das Ergebnis einer Untersuchung gesunder Probanden von Flomenberg et al. [23] zeigt auf, daß Adenovirus-spezifische CD4 positive T-Zellen im Körper verbleibende Antigene erkennen und lebenslang eine Immunantwort auf Adenovirus auslösen.

Interessant wäre es nun also, herauszufinden, ob man durch die Höhe der Adenovirus-spezifischen T-Zellen der gesunden Stammzellspender eine Aussage treffen kann für die Immunrestitution nach Transplantation des Patienten, ob eine hohe Frequenz Adenovirus-spezifischer T-Zellen der gesunden Spender die Regeneration des Patienten in der ersten Phase nach Transplantation beschleunigen kann.

4.3 Patienten vor Transplantation

Im Vergleich zu den oben dargestellten gesunden Spendern lagen die Mittelwerte der CD3-, der CD8- und der CD4- positiven Adenovirus-spezifischen T-Zellen der 6 Patienten vor Transplantation deutlich niedriger,

jedoch waren alle 3 Lymphozytenpopulationen sehr ausgeglichen auf einer ungefähr gleichen Höhe von 0,1%. Daß die Frequenz der Lymphozytenpopulationen bei den Patienten vor Stammzelltransplantation geringer ist liegt unter anderem daran, daß die Aktivierbarkeit der T-Zellen im Allgemeinen und somit auch der Adenovirus-spezifischen T-Zellen nach Chemotherapie reduziert sein kann.

Es ist festzuhalten, daß die oben dargestellten Ergebnisse der Patienten vor Transplantation in ihrer Aussage dadurch eingeschränkt werden, daß die Anzahl der gemessenen Proben nicht hoch genug ist, um zu einem signifikanten Vergleich herangezogen zu werden.

4.4 Vergleich der beiden Messmethoden: Intrazelluläre Zytokinfärbung und Zytokin-Sekretionsassay

Die Hauptanwendung des Zytokin-Sekretionsassays besteht in der Detektion, dem Isolieren und Analysieren von vitalen Leukozyten basierend – wie der Name schon sagt - auf der Sekretion von Zytokinen wie Interferon gamma (INF- γ), Interleukin 4 oder Interleukin 10. Nach Stimulation mit einem spezifischen Antigen und durch Zugabe einer bestimmten Reagenz werden Zytokine gebunden, mit einem Antikörper versehen und im Durchflußzytometer analysiert.

Das Verfahren der Meßmethode der intrazellulären Zytokinfärbung dient der intrazellulären Antigen-Analyse mittels Durchflußzytometrie. Zwei verschiedene Reagenzien dienen der Fixierung der Zellen in Suspension und der Permeabilisierung der Zellmembran, wodurch Antikörper zu den intrazellulären Strukturen vordringen.

Beim Vergleich der beiden Bearbeitungsmethoden, dem Zytokin-Sekretionsassay und der intrazellulären Zytokinfärbung wurden jeweils CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Adenovirus-spezifische T-Zellen gemessen und einander gegenübergestellt. Bei keiner der 3 Paarungen konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Ansonsten fällt in Abb. 4 auf, daß die Messung des Zytokin-Sekretionsassays immer eine etwas höhere Anzahl der Lymphozytenpopulationen aufweist als die intrazelluläre Zytokinfärbung.

Eine verständliche Erklärung dafür ist, daß die erste Methode eine hohe Sensitivität und geringere Spezifität hat mit folglich höheren Werten, da einige falsch positive Lymphozyten zusätzlich erfaßt werden, und zweite Methode eine geringere Sensitivität mit hoher Spezifität hat, also werden zwar keine falsch positiven Lymphozyten gemessen aber auch einige richtig positive nicht erfaßt.

4.5 Regeneration von 4 Patienten nach Stammzelltransplantation

Bei der Untersuchung der Adenovirus-spezifischen CD3-/ CD4- und CD8 positiven T-Zellen bei 4 von den Ausgangsbedingungen her (Art der Transplantation, Alter, Art des Spenders) sehr unterschiedlichen Patienten weist jeder Patient eine individuelle Kurve im Bezug auf seine Regeneration nach Stammzelltransplantation auf.

Es fällt jedoch auf, daß trotz der Unterschiede im Bezug auf die Ausgangsbedingungen die Adenovirus-spezifischen T-Zellen bei allen 4 Patienten in gleicher Weise kontinuierlich zunehmen.

Diese Beobachtung bestätigt einmal mehr die Auswertung der Gesamtheit an Patienten, die noch im Folgenden diskutiert werden wird.

4.6 Regeneration Adenovirus-spezifischer T-Zellen bei Patienten nach Stammzelltransplantation

Aus dem im Ergebnisteil dargestellten Diagramm Abb. 3.6 der Entwicklung der Adenovirus-spezifischen T-Zellen von 53 Patienten im Alter von 3 Monaten bis 19 Jahren nach Stammzelltransplantation geht deutlich eine kontinuierliche Steigerung der Anzahl der T-Zellen im ersten Jahr und darüber hinaus hervor.

Man sieht bei allen Lymphozytenpopulationen die Wichtigkeit der ersten 365 Tage für die Immunrekonstitution.

Chakrabarti et al. [5] untersuchten das Management von asymptomatischen Patienten mit Adenovirusinfektion nach Stammzelltransplantation. Risikofaktoren für eine invasive Adenoviruserkrankung waren die Virusisolation von verschiedenen Geweben, eine positive Spenderserologie und einer Abstoßungsreaktion (GvHD), als entscheidender Faktor für den Schutz vor einer Infektion wurde jedoch die Rekonstitution der Lymphozyten zum Zeitpunkt der ersten Virusisolation angesehen.

Richard et al. [18] kamen aufgrund ihrer Messungen ebenfalls zu der Erkenntnis, daß die Frequenz der Adenovirus-spezifischen T-Zellen ein ganz entscheidender Faktor bei der Immunabwehr gegen eine Adenovirus-Infektion ist und daß die Regeneration dieser spezifischen T-Zellen den klinischen Verlauf der erkrankten Kinder nach Stammzelltransplantation verbessert.

Es wird vermutet, daß das Risiko einer schweren Adenovirusinfektion in der Immunsuppression liegt, aus diesem Grund werden Patienten, deren absolute Lymphozytenanzahl bei $>300/\mu\text{l}$ liegen klinisch und virologisch beobachtet, bei asymptomatischen Patienten mit Immunsuppression wird die Suppression des Immunsystems auf ein Minimum reduziert und bei Patienten mit einer absoluten Lymphozytenzahl $<300/\mu\text{l}$ und positiver PCR oder einer Abstoßungsreaktion (Graft versus Host Disease) wird eine antivirale Therapie begonnen. Aus den Ergebnissen bei Chakrabarti et al. wird ebenfalls geschlossen, daß das Risiko einer Adenovirusinfektion geringer ist bei Patienten, die ein T-Zell-depletiertes Transplantat bekommen hatten. Durch die Gabe von Immunsuppression als Therapie gegen eine Abstoßungsreaktion wird das Risiko gesteigert.

Fraglich ist, ob die absolute Anzahl der Lymphozyten größer oder kleiner als $300/\mu\text{l}$ zum Zeitpunkt der ersten Detektion und Isolation des Adenovirus als Maßstab für die Therapie und das Management einer Adenovirusinfektion sinnvoll ist, da Lymphozyten eine Mischpopulation sind und nur ein kleiner Anteil für die spezifische Virusantwort wichtig ist. Dieser Anteil scheint aber essenziell zu sein. Referenzwerte der Lymphozytenanzahl eines gesunden

Probanden sind 1500–4500/ μ l. Die Funktion der Lymphozyten bezieht sich auf die Parameter der Proliferation und der Differenzierung und besonders auf die Effektorfunktionen, also der Abtötung von Zielzellen durch zytotoxische T-Zellen.

Sicher ist die Aussage von Chakrabarti richtig, daß die Anzahl der Lymphozyten etwas über den Immunstatus im Allgemeinen aussagt. Sie hängt damit auch maßgeblich mit der Abwehr und Überwindung einer bestehenden Infektion zusammen, desgleichen gilt die Feststellung, daß das Risiko der Erkrankung an Adenovirus entsprechend ansteigt je größer die Immunsuppression des Patienten ist.

Jedoch ist aufgrund dieser Ergebnisse eine Einteilung nach den spezifischen T-Zellen sinnvoller, da der Parameter der vorhandenen Lymphozyten ohne die Aussage der Spezifität explizit für Adenovirus zu allgemein ist. Je höher die Anzahl der spezifischen T-Zellen ist, desto besser ist die Regeneration des Immunsystems auf die Adenovirus-Infektion zu reagieren.

4.7 Regeneration der Adenovirus-spezifischen T-Zellen von Patienten nach Stammzelltransplantation im Vergleich zu gesunden Spendern

Man sieht beim Vergleich der T-Zellen gesunder Spender mit Meßwerten der stammzelltransplantierten Patienten bezüglich spezifischer positiver T-Zellen, daß nach ca. einem Jahr nach Transplantation der Meßwert der Regeneration der T-Zellen nahezu dem Wert gesunder Spender entspricht.

Dieses Ergebnis bestätigt die bereits gemachte Beobachtung, daß die Regeneration der spezifischen T-Zellen im Laufe des ersten Jahres eine besondere Schlüsselrolle spielt.

4.8 Vergleich von Patienten mit haploidentischen Familienspendern, HLA-identischen Geschwisterspendern und HLA-identischen Fremdspendern

Welche Transplantationsarten, abhängig vom Spender, sind nun die mit der schnellsten Regeneration?

Bei der autologen Stammzelltransplantation sind Virusinfektionen im Vergleich zu der allogenen Stammzelltransplantation selten ernste Komplikationen.

Artikel von Hale et al. [11] und Howard et al. [9] berichten von einer Inzidenz von 1% bzw. 3% bei einer autologen Stammzelltransplantation an Adenovirus zu erkranken im Gegensatz zu einer Infektionsrate von 19,3% bzw. 16% nach allogener Stammzelltransplantation. Die Infektionsrate ist also bei der autologen Stammzelltransplantation deutlich geringer.

Wie man aus der Abbildung 12 im Ergebnisteil sehen kann sind die Unterschiede zwischen den vom Spender abhängigen Untergruppen, also haploidentische Familienspender, HLA-identische Geschwisterspender und HLA-identische Fremdspender in dem Zeitraum >365 Tage nach Stammzelltransplantation nicht signifikant. Man kann insgesamt eine deutlich ansteigende Entwicklung der Adenovirus-spezifischen T-Zellen feststellen. Aufgrund dieser Messungen ist die Aussage nicht möglich zu sagen, daß eine der Untergruppen im gemessenen Zeitraum besser regeneriert als die anderen. Was jedoch zu bemerken ist ist, daß diese Aussage nur eine begrenzte Aussagekraft hat, da die Fallzahlen, die gemessen wurden, für eine sichere signifikante Aussage zu gering sind.

Diese Arbeit befaßt sich aber ausschließlich mit allogener Transplantation.

In der Differenzierung innerhalb der Untergruppe der allogenen Stammzelltransplantationen, also haploidentische Familienspender, HLA-identische Geschwisterspender und HLA-identische Fremdspender, gibt es unterschiedliche Berichte.

Ein Artikel von Baldwin et al. [6] betrachtet die Transplantation durch HLA-identische Fremdspender zusammen mit Transplantation bei

Hochrisikopatienten als potentiellen Risikofaktor für eine Adenovirusinfektion. In der Baldwin- Studie erkrankten 26% der Patienten, die durch HLA-identische Fremdspender transplantiert wurden im Gegensatz zu einer Infektionsrate von nur 9 % nach Transplantation durch HLA-identische Geschwisterspender.

Aus einer Studie von Hoffman et al. [21] und Amrolia et al. [69] geht ebenso hervor, daß im Vergleich zu HLA-identischen Geschwisterspendern eine deutlich häufigere positive Adenovirus-spezifische Kultur bei HLA-identischen Fremdspendern und haploidentischen Geschwisterspendern nachgewiesen werden konnte (62% versus 27%).

Legrand et al [22] und Bordigoni et al. [29] schreiben von einer höheren Inzidenz von Adenovirusinfektionen unter Empfängern HLA-identischer Fremdspender im Gegensatz zu Transplantatempfängern von HLA-identischen Geschwistern, die der profunden und persistierenden Immunschwäche der Empfänger zugeschrieben wird.

Was insgesamt deutlich wird ist, daß sich, ob nun eine Therapie mit Cidofovir, Ribavirin oder mit einer anderen Medikation erfolgte, bei einer Transplantation durch HLA-identische Geschwisterspender die klinische Symptomatik eher verbesserte als bei der Transplantation durch die anderen beiden Transplantatspender [28].

Im Gegensatz zu dem oben genannten Artikel legen Howard et al. [9] ebenso wie Hale et al. [11] in ihren Veröffentlichungen dar, daß kein signifikanter Unterschied der Inzidenz zwischen HLA-identischen Fremdspendern verglichen mit haploidentischen Familienspendern und HLA-identischen Geschwisterspendern bewiesen werden konnte, was sich mit den in dieser Arbeit durchgeführten Beobachtungen deckt. Wie in den genannten Literaturquellen konnte in dieser Arbeit nach dem gemessenen Zeitraum auch kein Unterschied zwischen den beobachteten Untergruppen festgestellt werden.

Eine Studie von Lang et al. [32] besagt, daß das Verwenden von Stammzellen haploidentischer Verwandten für all diejenigen Kinder besonders in Frage kommt, die einer Transplantation bedürfen jedoch kein HLA-identischer Spender vorhanden ist.

4.9 Vom Transplantat abhängige Untergruppe: unselektioniertes Knochenmark, selektionierte Stammzellen aus Leukoapheresat und zusätzliche T-Zellgaben

In einem Vergleich der 3 unterschiedlichen Transplantatarten, also unselektioniertes Knochenmark, selektionierte Stammzellen aus Leukoapheresat und zusätzlichen T-Zellgaben, konnte keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Insgesamt wird, bezogen auf die Zeit, eine ansteigende Entwicklung der Adenovirus-spezifischen T-Zellen ersichtlich. In dieser Messung wird die Aussage durch eine geringe Fallzahl eingeschränkt. Entgegen den Erwartungen war die Adenovirus-spezifische Immunrekonstitution in keiner der Gruppen signifikant schlechter. Dies ist insofern bemerkenswert, als die T-Zellregeneration bei T-Zelldepletion Transplantationen langsamer vonstatten geht.

4.10 Alle Meßdaten der Adenovirus-spezifischen CD3+ -/ CD8+- und CD4+-T-Zellen

Wenn man sich die Messungen der vom Spender abhängigen Untergruppen bezüglich ihrer Regeneration nach der Stammzelltransplantation anschaut kann man eine insgesamt gute Rekonstitution der Adenovirus-spezifischen T-Zellen innerhalb eines Jahres bzw. darüber hinaus erkennen. Die ansteigende Anzahl der spezifischen Zellen deutet also auf eine geringere Anfälligkeit bzw. einen höheren Schutz vor Infektion hin.

Eine besonders gute Rekonstitution im Verlauf fällt entgegen der Erwartungen bei den haploidentischen Familienspendern auf, da haploidentische Familienspender eher eine schlichtere Regeneration haben. Bei der Zeitangabe >1 Jahr ist der Unterschied der Regeneration nach Transplantation durch haploidentische Familienspender, HLA-identische Geschwisterspender und HLA-identische Fremdspender nicht mehr signifikant, was sich mit den Erkenntnissen der Artikel von Howard et al. und Hale et al. deckt und der

Aussage von Balwin et al, daß die Transplantation durch HLA-identische Familienspender als potentieller Risikofaktor einzuschätzen ist, entgegensteht .

4.11 Spezifität der Messung von Adenovirus-spezifischen T-Zellen

Die Grundfrage ist, ob die Zellen, die wir messen, Adenovirus-spezifisch sind. Die Immunität bei einer Virusinfektion hängt maßgeblich von der Aktivität der sogenannten Gedächtnis- oder Effektor-T-Zellen ab, deren funktionelle Heterogenität vor allem in ihrem Sekretionspotenzial von Zytokinen wie Interleukin 2 und Interferon- γ (zusammengefaßt unter dem Begriff TH1) und Interleukin 4 und Interleukin 10 (zusammengefaßt unter dem Begriff TH2) darstellt. In einem Artikel von Sester et al. [10] wird genau diese Aktivierung der spezifischen T-Zellen mit ihrer Produktion von Th1 Zytokinen beschrieben.

Daß die Anzahl der virusspezifischen T-Zellen während einer akuten Infektion dramatisch ansteigt und nach der erfolgreichen Kontrolle des Virus durch das Immunsystem wieder absinkt, belegt derselbe Artikel von Sester et al. [10]. Daraus läßt sich schließen, daß die Anwesenheit von nachweisbaren und meßbaren Adenovirus-spezifischen T-Zellen die Präsenz des Adenovirus beweist. Sollten keine Adenovirus-spezifischen T-Zellen meßbar sein, bedeutet das entweder die Abwesenheit des Virus oder, daß das Virus zwar anwesend aber unkontrollierbar ist, weil das Immunsystem nicht spezifisch reagieren kann.

In einem Artikel von Flomenberg et al. [23] wird ebenfalls dargestellt, daß die Adenovirus-spezifische Proliferation von den ebenfalls in dieser Arbeit gemessenen CD4 positiven T-Zellen vermittelt wird.

Die in den Messungen verwendete Durchflußzytometrie erlaubt es, die Fähigkeit der Zytokine zur Synthese von CD4⁺-und CD8⁺-spezifischen T-Zell-Untergruppen nachzuweisen [15].

Daß die Messung der Immunantwort im Durchflußzytometer antigenspezifisch ist, in dieser Arbeit also Adenovirus-spezifisch, wird in einem Artikel von Waldrop et al. [14] belegt.

Die Unterschiede in der Zytokinproduktion sind auf die Anzahl der Zellen zurückzuführen, die in der Lage sind, eine signifikante Menge dieser Zytokine zu produzieren. Auch wird vermutet, daß das Expressionspotenzial jedes einzelnen der Zytokine unabhängig voneinander reguliert [14, 15] und durch bestimmte Stimuli unterschiedlich stark aktiviert wird. Das ursprüngliche Einteilungssystem TH0, TH1, TH2 reicht folglich nicht ganz aus, um das Spektrum der Komplexität der Zytokinsynthese ganz zu erfassen. Durch die kurze Zeit der *in vitro*-Inkubation und der Sekretionsinhibition durch Brefeldin A vermindert sich das Risiko, daß T-Zellen oder akzessorische Zytokine die Zytokinantwort der T-Zellen verändern.

Sester et al. (Age related decrease in Adenovirus-specific T cell responses) [10] weisen auch nach, daß Adenovirus-spezifische T-Zellen direkt aus dem Blut nach Stimulation der Adenovirus-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mit Adenovirus-Antigen, einer Positiv- und einer Negativkontrolle durchflußzytometrisch nachgewiesen werden können. Im Gegensatz zu den Messungen dieser Arbeit sind laut der Sester-Studie jedoch die CD8⁺ T-Zellen deutlich schlechter nachweisbar als die CD4⁺ T-Zellen.

Um eine Antwort auf die Frage nach der Spezifität der Messungen zu geben beziehe ich mich auf einen Artikel von L. Picker et al. [15], in dem herausgearbeitet wird, daß die auch von mir verwendeten Sekretion Assays einen Nachweis der Anzahl der Zellen ermöglichen, die ein bestimmtes Zytokin produzieren, in dieser Arbeit dem Adenovirus-spezifischen Zytokin. Mit den Messungen konnte in dieser Studie von L. Picker et al. eine genaue Aussage über die Regeneration der CD3⁺, CD8⁺ und CD4⁺ Adenovirus-spezifischen T-Zellen nach Transplantation gemacht werden.

4.12 Individuelle Unterschiede in der Regeneration der spezifischen T-Zellen

Trotz aufwendiger retrospektiver Studien bleibt immer noch unklar, warum manche Patienten einen schweren Verlauf der Adenovirusinfektion entwickeln und ihr im schlimmsten Falle erliegen und manche einen leichteren Verlauf der Erkrankung haben [5].

Warum aber regenerieren nun manche Patienten besser als andere?

Zum einen muss beachtet werden, daß es sich bei der Population, die untersucht wurde, um eine sehr heterogene Gruppe handelt. Die Patienten unterscheiden sich im Bezug auf ihr Alter, ihre Erkrankung, ihre Art des Transplantatspenders, also Stammzellspende durch haploidentische Familienspender, HLA-identische Geschwisterspender oder HLA-identische Fremdspender, oder ihre Art des Transplantates und dessen Anreicherung, also unselektioniertes Knochenmark, selektionierte Stammzellen aus Leukoapheresat und zusätzliche T-Zellgaben. Außerdem wurde bei manchen von ihnen eine Adenovirusinfektion nachgewiesen, bei anderen nicht.

Die Streubreite der gemessenen Daten ist groß, ebenso wie die Standardabweichung. Bei einigen wurde eine niedrige Frequenz Adenovirus-spezifischer T-Zellen nachgewiesen, bei anderen wiederum eine hohe.

Des weiteren nehmen verschiedene Faktoren Einfluß auf die Beantwortung der Frage nach der Regeneration. Dabei muß die Regeneration aufgeschlüsselt werden in % T-Zellen insgesamt oder Adenovirus-spezifische T-Zellen.

In einem Artikel von Chakrabarti et al. [5] wird die Hauptrolle in der Entwicklung der Infektion der Immunsuppression zugeschrieben. In diesem Falle ist natürlich ein großes Interesse an der Erforschung der Immuntherapie gegeben.

4.13 Ausblick in Ursachen der Adenovirusinfektion Forschung und Therapie

Theorien zur Ursache der Adenovirusinfektion nach Transplantation gehen in Richtung Reaktivierung des endogenen Virus als Richtung exogener Ursache [29, 34].

Es wird bei Erwachsenen vermutet [5], daß die Infektion auch von Spenderzellen mit positiver Virusserologie übertragen werden kann, jedoch kann daraus keine Vorhersage für eine sicher stattfindende Übertragung getroffen werden. Besonders prädisponiert sind wohl eher Patienten mit extremer Immunsuppression oder Patienten mit einer nur sehr langsamen und schwachen Immunrekonstitution.

Da wie oben schon erwähnt die aktuellen Behandlungsmöglichkeiten einer Adenovirusinfektion nach Stammzelltransplantation eingeschränkt sind und die medikamentöse Therapie mit Ribavirin, Vidarabin und Cidofovir bis jetzt nicht den gewünschten Erfolg gezeigt hat, unter anderem auch aufgrund ihrer in hohem Maße nephrotoxischen Nebenwirkungen, besteht immer noch ein hoher Bedarf an der Forschung über Therapiemöglichkeiten. Neue Studien zeigen beim Zytomegalievirus die Möglichkeit einer adoptiven Immun-T-Zell-Therapie auf wenn nicht ausreichend spezifische T-Zellen für eine Immunantwort vorhanden sind [16, 45]. Hierbei wurden nach der ex vivo – Expansion Adenovirus-spezifischer T-Zellen auf 25 000 T-Zellen pro Kilogramm Körpergewicht des Empfängers und nach darauf folgender Restimulation mit Adenovirus-Antigen eine bedeutende Produktion und Freisetzung von Adenovirus-spezifischem Interferon- γ in Sekretionsassays nachgewiesen. Somit könnten im Rahmen einer adoptiven Immuntherapie die expandierten Adenovirus-spezifischen T-Zellen nach einer Stammzelltransplantation infundiert werden.

Hierbei ist entscheidend für die Effektivität, daß die Therapie so früh wie möglich in der Posttransplantationsphase begonnen wird.

Vorteil der Interferon- γ -Sekretionsassays ist die Schnelligkeit und Reproduzierbarkeit der Methode unter Standardbedingungen, des weiteren besteht eine hohe Adaptierbarkeit an unterschiedliche Antigene zur Herstellung Antigen-spezifischer T-Zellen und im Vergleich zu der Infusion unmanipulierter Lymphozyten [17, 29] ein reduziertes Risiko der Graft versus Host-Reaktion und der Alloreaktivität und eine deutliche Verbesserung der Spezifität.

Der Artikel führt die Ergebnisse dieser Arbeit weiter in Richtung klinische Anwendung, denn wenn nicht ausreichend Adenovirus-spezifische T-Zellen meßbar sind und somit das Risiko einer Infektion erhöht ist, ist der Therapieansatz der Expansion und anschließender Infundierung spezifischer T-Zellen eine neue Chance zur Verhinderung einer Adenovirusinfektion.

5 Zusammenfassung

Die Adenovirusinfektion nach allogener Stammzelltransplantation (SZT) ist eine schwere Komplikation im Kindesalter mit hoher Morbidität und Mortalität. Für die Bewältigung der Infektion ist die Virus-spezifische T-Zellrekonstitution essentiell. Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, die Regeneration Adenovirus (ADV) – spezifischer T-Zellen nach SZT zu untersuchen. Im ersten Teil wurde bei gesunden Spendern (n=41) und Patienten vor (n=6) und nach SZT (n=56, Alter 9,49 Jahre \pm 5,96) die Menge ADV-spezifischer T-Zellen in Prozent bestimmt. Die Detektion spezifischer T-Zellen erfolgte über spezifischen Interferon (INF) γ -release nach ex-vivo Stimulation mit viralem Antigen. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen sezerniertem, extrazellulär gemessenem IFN γ und intrazellulär bestimmtem IFN γ . Die Frequenz ADV-spezifischer T-Zellen bei gesunden Probanden war im Vergleich zu transplantierten Patienten deutlich höher. Erst etwa ein Jahr nach SZT entsprach der Meßwert der spezifischen T-Zellen nahezu dem gesunder Probanden. Der zweite Teil untersucht die Rege-neration der ADV-spezifischen T-Zellen nach SZT und ob diese vom Spendertyp und/oder der Transplantatart abhängen. Innerhalb des ersten Jahres nach SZT erfolgte ein deutlicher Anstieg der Regeneration. Im Vergleich war die spezifische T-Zellrekonstitution bei Patienten, welche von Fremd- (n=24), Geschwister-(n=13) oder haploidentischen Familienspendern (n=12) transplantiert wurden, nicht signifikant verschieden. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Transplantatarten unselektioniertes Knochenmark (n=23), selektionierte Stammzellen aus Leukoapheresat mit (n=24) und ohne (n=21) zusätzliche T-Zellgaben und daß T-Zelldepletiert transplantierte Patienten absolut eine verzögerte T-Zellrekonstitution haben. Zusammenfassend zeigt sich, daß ADV-spezifische T-Zellen in peripherem Blut anhand spezifischer T-Zellstimulation bestimmt werden können und die ADV-gerichtete T-Zellantwort quantitativ erst nach einem Jahr derer gesunder Spender entspricht. Aufgrund der Relevanz der T-Zellantwort der Abwehr der Adenovirusinfektionen erscheint eine gezielte Bestimmung spezifischer T-Zellen entscheidend für die Einschätzung des Infektionsrisikos nach SZT.

6 Anhang

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: PATIENTENSPEZIFISCHE DATEN.....	19
TABELLE 2: GESUNDE SPENDER.....	21
TABELLE 3: FÄRBESCHEMA DER ANTIKÖRPERFÄRBUNG.....	30
TABELLE 4: BERECHNUNG DER BREFELDINKONZENTRATION	32
TABELLE 5: ANTIKÖRPERFÄRBUNG DER INTRAZELLULÄREN ZYTOKINFÄRBUNG.....	32
TABELLE 6: MITTELWERTE UND STANDARDABWEICHUNGEN DER CD3+-, CD8+- UND CD4+- T-ZELLEN IM VERLAUF NACH STAMMZELLTRANSPLANTATION.....	46
TABELLE 7: MITTELWERTE UND STANDARDABWEICHUNGEN DER ABSOLUTWERTE DER VOM SPENDER ABHÄNGIGEN UNTERGRUPPEN IM VERLAUF	52
TABELLE 8: MITTELWERTE UND STANDARDABWEICHUNG DER VOM TRANSPLANTAT ABHÄNGIGEN UNTERGRUPPE IM VERLAUF	56

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: BEISPIELHAFTE DARSTELLUNG EINER AUSWERTUNG DER IM DURCHFLUßZYTOMETER GEMESSENEN DATEN.....	27
ABBILDUNG 2: ADENOVIRUS-SPEZIFISCHE T-ZELLEN BEI GESUNDEN SPENDERN.	36
ABBILDUNG 3: 6 PATIENTEN VOR STAMMZELLTRANSPLANTATION.....	37
ABBILDUNG 4: VERGLEICH DES ZYTOKIN- SEKRETIONSASSAYS UND DER INTRAZELLULÄREN ZYTOKINFÄRBUNG.....	39
ABBILDUNG 5: IMMUNREKONSTITUTION DER ADENOVIRUS-SPEZIFISCHEN T-ZELLEN BEI 4 PATIENTEN.....	41
ABBILDUNG 6: IMMUNREKONSTITUTION DER CD3+ T-ZELLEN BEI 4 PATIENTEN.....	42
ABBILDUNG 7: REGENERATION ADENOVIRUS SPEZIFISCHER T-ZELLEN ALLER PATIENTEN NACH STAMMZELLTRANSPLANTATION	43
ABBILDUNG 8: VERLAUF DER REGENERATION ADENOVIRUS-SPEZIFISCHER T-ZELLEN NACH TRANSPLANTATION BEI ALLEN 53 UNTERSUCHTEN PATIENTEN NACH STAMMZELLTRANSPLANTATION	45
ABBILDUNG 9: GESUNDE SPENDER IM VERGLEICH ZU PATIENTEN NACH STAMMZELLTRANSPLANTATION	47
ABBILDUNG 10: PROZENTSATZ DER PATIENTEN IM ZEITABSTAND ZUR TRANSPLAN- TATION ÜBER 0,2% ADENOVIRUS-SPEZIFISCHER CD3 POSITIVER T-ZELLEN	48

ABBILDUNG 11: CD3 SPEZIFISCHE REGENERATION NACH STAMMZELLTRANSPLANTATION IN ABHÄNGIGKEIT DES SPENDERS.....	51
ABBILDUNG 12: CD3 SPEZIFISCHE REGENERATION NACH STAMMZELLTRANSPLANTATION IN ABHÄNGIGKEIT DES TRANSPLANTATES.....	55

Literaturverzeichnis

1. **Hilleman MR, Werner JR.** Recovery of a new agent from patients with acute respiratory illness. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.*1954;85:183-188.
2. **La Rosa AM, Champlin RE, Mirza M, Gajewski J, Giralt S, Rolston KV, Raad I, Jacobson K, Kontoyiannis D, Elting L, Whimbey E.** Adenovirus infections in adult recipients of blood and marrow transplants. *Clinical Infectious Diseases.*2001 Mar;32:871-76.
3. **Russel WC.** Update on Adenovirus and its vectors. *Journal of General Virology.*2000 Nov;81:2573-2604.
4. **Walls T, Shankar A, Shingadia D** (2003). Adenovirus: An increasingly important pathogen in paediatric bone marrow transplant patients. *The Lancet Infectious Diseases.*2003 Feb;3:79-86.
5. **Chakrabarti S, Mautner V, Osman H.** Adenovirus infections following allogenic stem cell transplantation: Incidence and outcome in relation to graft manipulation, immunosuppression, and immune recovery. *Blood.*2002 Feb;4:Number 5.
6. **Baldwin A, Kingman H, Darville M, Foot AB, Grier D, Cornish JM, Goulden N, Oakhill A, Pamphilon DH, Steward CG, Marks DI.** Outcome and clinical course of 100 patients with adenovirus infection following bone marrow transplantation. *Bone marrow transplantation.*2000 Dec;26:1333-1338.
7. **Janeway CA, Travers P, Walport M,** et al. Immunobiology-the immune system in health and disease 5th edition.London.*Garland publishing.* 2001,Part I-V.
8. **Carrigan DR.** Adenovirus infections in immunocompromised host. *Am J Med.*1997 Mar;102:71-74.
9. **Howard DS, Phillips II GL, Reece DE, Munn RK, Henslee-Downey J, Pittard M, Barker M, Pomeroy C.** Adenovirus infections in hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis.*1999 Dec;29:1494-1501.
10. **Sester M, Sester U, Alarcon Salvador S, Heine G, Lipfert S, Girndt M, Gartner B, Kohler H.** Age – related decrease in adenovirus – specific T cell responses. *J Infect Dis.*2002 May;185:1379-1387.
11. **Hale GA, Heslop HE, Krance RA, Brenner MA, Jayawardene D, Srivastava DK, Patrick CC.** Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.*1999 Feb;23:277-282.
12. **Flomenberg P, Babbitt J, Drobycki WR, Ash RC, Carrigan DR, Sedmak GV, McAuliffe T, Camitta B, Horowitz MM, Bunin,** et al. Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis.*1994 Apr;169:774-781.
13. **Speer C, Gahr M.** Das Kinderheilkunde-Buch für junge Pädiater. Springer Verlag Heidelberg Berlin, 1. Auflage 2001.

14. Waldrop SL, Pitcher C, Peterson D, Maino VC, Picker LJ. Determination of Antigen-specific Memory/ Effector CD4+ T Cell frequencies by flow cytometry. *J.Clin.Invest.*1997 Apr;99:1739-1750.
15. Picker L, Singh M, Zdraveski Z, Treer JR, Waldrop SL, Bergstresser Pr, Maino VC. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human Memory/ Effector T – cells by Flow Cytometry. *Blood.*1995 Aug;86:1408-1419.
16. Feuchtinger T, Lang P, Hamprecht K, et al. Isolation and expansion of human adenovirus – specific CD4+ and CD8+ T cells according to IFN- γ secretion for adjuvant immunotherapy. *Experimental Hematology.*2004 Mar;32:282-289.
17. Phowthongkum P, Siritantikorn S, Suankratay C. Adenovirus hemorrhagic cystitis in a stem cell transplant patient: the first reported case in Southeast Asia.2004 Sept;87 Suppl 2:S288-91.
18. Feuchtinger, Luecke J, Hamprecht K, Richard C, Handgretinger R, Schumm M, Greil J, Bock T, Niethammer, Lang P. Detection of adenovirus specific T – cells in children with adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol.*2005 Feb;128(4):503-9.
19. Raboni SM, Siqueira MM, Portes SR, Pasquini R. Comparison of PCR, enzyme immunoassay and conventional culture for adenovirus detection in bone marrow transplant patients with hemorrhagic cystitis. 2003 Aug;27(3):270-5.
20. Chuang YY, Chiu CH, Wong KS, Huang JG, Huang YC, Chang LY, Lin TY. Severe adenovirus infection in children. *J Microbiol Immunol Infect.*2003 Mar;36(1):37-40.
21. Hoffman JA, Shah AJ, Ross LA, Kapoor N. Adenoviral infections and a prospective trial in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.*2001 Jul;7(7):388-94
22. Legrand F, Berrebi D, Houhou N, Freymuth F, Faye A, Duval M, Mougnot JF, Peuchmaur M, Vilmer E. Early diagnosis of adenovirus infection and treatment with cidofovir after bone marrow transplantation in children. *Bone Marrow Transplant.*2001 Mar;27(6):621-6
23. Flomenberg P, Piaskowski V, Truitt RL, Casper JT. Characterization of human proliferative T cell responses to adenovirus. *J Infect Dis.*1995 May;171(5):1090-6
24. Ljungman P, Ribaud P, Eyrich M, Matthes-Martin S, Einsele H, Bleakley M, Machaczka M, Bierings M, Bosi A, Gratecos N, Cordonnier C, Infectious Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Cidofovir for adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a survey by the Infectious Diseases Working Party of the European Group of Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.*2003 Mar.31(6):481-6.

25. **Murphy GF, Wood DP Jr, McRoberts JW, Henslee-Downey PJ.** Adenovirus-associated hemorrhagic cystitis treated with intravenous ribavirin. *J Urol.* **1993** Mar;149(3):565-6.
26. **Hierholzer JC.** Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin Microbiol Rev.* **1992** Jul;5(3):262-74
27. **Barbera JA, Martin-Campos JM, Ribalta T, Carreras E, Liopart A, Sierra J, Rozman C, Rodriguez-Roisin R.** Undetected viral infection in diffuse alveolar damage associated with bone marrow transplantation. *Eur Respir J.* **1996** Jun;9(6):1195-200.
28. **Miyamura K, Hamaguchi M, Taji H, Kanie T, Kohno A, Tanimoto M, Saito H, Kojima S, Matsuyama T, Kitaori K, Nagafuji K, Sato T, Kodera Y.** Successful ribavirin therapy for severe adenovirus hemorrhagic cystitis after allogeneic marrow transplant from close HLA donors rather than distant donors. *Bone Marrow Transplantation.* **2000** Mar;25(5):545-548.
29. **Bordigoni P, Carret AS, Venard V, Witz F, Le Faou A.** Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis.* **2001** Apr;32:1290-7
30. **Langer T, Beck J, Gravou-Apostulatou C, Lang P, Handgretinger R, Greil J** Successful treatment of primary refractory acute myeloid leukemia with megadose stem cell transplantation, bone marrow boost and reduced intensity conditioning avoiding chronic graft vs. host disease and severe late toxicity. *Pediatr Transplant.* **2003** Dec;7(6):494-6.
31. **Liles WC, Cushing H, Holt S, Bryan C, Hackman R.** Severe adenoviral nephritis following bone marrow transplantation: successful treatment with intravenous ribavirin. *Bone Marrow Transplant.* **1993** Oct;12(4):409-12.
32. **Lang P, Greil J, Bader P, Handgretinger R, Klingebiel T, Schumm M, Schlegel PG, Feuchtinger T, Pfeiffer M, Scheel-Walter H, Fuhrer M, Martin D, Niethammer D.** Long-term outcome after haploidentical stem cell transplantation in children. *Blood Cells Mol Dis.* **2004** Nov-Dec;33(3):281-287.
33. **Pham TT, Burchette JL Jr, Hale LP.** Fatal disseminated adenovirus infections in immunocompromised patients. *J Clin Pathol.* **2003** Oct;120(4):575-83.
34. **Shields AF, Hackman RC, Fife KH, Corey L, Meyers JD.** Adenovirus infections in patients undergoing bone marrow transplantation. *Engl J Med.* **1985** Feb;312(9):529-33.
35. **Wasserman R, August CS, Plotkin SA.** Viral infections in pediatric bone marrow transplant patients. *Pediatr Infect Dis J.* **1988** Feb;7(2):109-15.
36. **Ljungman P, Gleaves CA, Meyers JD.** Respiratory virus infections in immunocompromised patients. *Bone Marrow Transplant.* **1989** Jan;4(1):35-40.

37. **Sencer SF, Haake RJ, Weisdorf DJ.** Hemorrhagic cystitis after bone marrow transplantation. Risk factors and complications. *Transplantation*.1993 Oct;56(4):875-9.
38. **Niemann TH, Trigg ME, Winick N, Penick GD.** Disseminated adenoviral infection presenting as acute pancreatitis. *Hum Pathol*.1993 Oct;24(10):1145-8.
39. **Matsuse T, Matsui H, Shu CY, Nagase T, Wakabayashi T, Mori S, Inoue S, Fukuchi Y, Orimo H.** Adenovirus pulmonary infections identified by PCR and in hybridisation in bone marrow transplant recipients. *J Clin Pathol*.1994 Nov;47(11):973-7.
40. **Childs R, Sanchez C, Engler H, Preuss J, Rosenfeld S, Dunbar C, van Rhee F, Plante M, Phang S, Barrett AJ.** High incidence of adeno – and polyomavirus – induced hemorrhagic cystitis in bone marrow allotransplantation for hematological malignancy following T cell depletion and cyclosporine. *Bone Marrow Transplant*.1998 Nov;22(9):889-93.
41. **Venard V, Carret AS, Corsaro D, Bordigoni O, Le Faou A.** Genotyping of adenovirus isolated in an outbreak in a bone marrow transplant unit shows that diverse strains are involved. *Journal of Hospital Infections*.2000 Jan;44(1):71-74
42. **Crooks BN, Taylor CE, Turner AJ, Osman HK, Abinun M, Flood TJ.** Respiratory viral infections in primary immune deficiencies. Significance and relevance to clinical outcome in a single BMT unit. *Bone Marrow Transplant*.2000 Nov;26(10):1097-102.
43. **Kojoaghlanian T, Flomenberg P, Horwitz MS.** The impact of adenovirus infections on the immunocompromised host. *Reviews in Medical Virology*.2003 May-Jun;13(3):155-171.
44. **De Jong J, Wermenbol A, Verwij – Uijterwaal MW, Slaterus KW, Wertheim-van Dillen P, Van Doornum GJ, Khoo SH, Hierholzert.** Adenoviruses from human immunodeficiency virus – infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and AD51 of species B1 and D, respectively. *J Med Biol*.1999 Dec;37(12):3940-45.
45. **Chakrabarti S, Collingham KE, Fegan CD, Pillay D, Milligan DW.** Adenovirus infections following haematopoietic stem cell transplantation: is there a role for adoptive immunotherapy? *Bone Marrow Transplant*.2000 Aug;26(3):305-7
46. **Akiyama H, Kurosu T, Sakashita C, Inoue T, Mori Si, Ohashi K, Tanikawa S, Sakamaki H, Onozawa Y, Chen Q, Zheng H, Kitamura T.** Adenovirus is a key in hemorrhagic cystitis associated with bone marrow transplantation. *Clin Infect Dis*.2001 May;32:1325-30
47. **Aristei C, Aversa F, Raymondi C, Marsella AR, Panizza BM, Perrucci E, Piro F, Maranzano E, Lupattelli M, Martelli MP, Latini P.** Allogenic matched T – cell depleted bone marrow transplantation for acute leukemia patients. *Cancer J Sci Am*.1996 Nov;2(6):330.

48. **Aversa F, Terenzi A, Carotti A, Felicini R, Jacucci R, Zei T, Latini P, Aristei C, Santucci A, Martelli MP, Cunningham I, Reisner Y, Martelli MF.** Improved outcome with T – cell depleted bone marrow transplantation for acute leukemia. *Journal of Clinical Oncology*.1999 May;17(5):1545.
49. **Hierholzer JC, Halonen PE, Dahlen PO, Bingham PG, McDonough MM.** Detection of adenovirus in clinical specimens by polymerase chain reaction and liquid – phase hybridization quantitated by time resolved fluorometry. *J Clin Microbiol*.1993 Jul;31(7):1886-91.
50. **Dalapathy S, Lily T, Roy S, Madhavan HN.** Developement and use of nested polymerase chain reaction (PCR) for the detection of adenovirus from conjunctivitis specimens. *Journal of Clinical Virology*.1998 Jul;11(1):77-84.
51. **Ko G, Cromeans T, Sobsey M.** Detection of infectious adenovirus in cell culture by mRNA reverse transcription – PCR. *Applied and Environmental Microbiology*.2003 Dec;69(12):7377-84.
52. **Banyai K, Mate Z, Adam E, Uj M, Nasz I, Szucs G.** Screening adenoviruses in stool samples: evaluation of a specific monoclonal antibody based enzyme immunoassay. *Acta Microbiol Immunol Hung*.2003 ;50(1):23-32.
53. **Leruez-Ville M, Minard V, Lacaille F, Buzyn A, Abachin E, Blanche S, Freymuth F, Rouzioux C.** Real – time blood plasma polymerase chain reaction for management of disseminated adenovirus infection. *Clin Infect Dis*.2004;38:45-52.
54. **Zintl F, Prager J, Sauerbrey A, Metzner G, Hermann J, Fuchs D.** Immunoreconstitution after human bone marrow transplantation. *Folia Haematol Int Mag Klin Blutforsch*.1989;519-26.
55. **Watanabe M, Kohdera U, Kino M, Haruta T, Nukuzuma S, Suga T, Akiyoshi K, Ito M, Suga S, Komada Y.** Detection of adenovirus DNA in clinical samples by SYBR Green real-time polymerase chain reaction assay. *Pediatr Int*.2005 Jun;286-91.
56. **Van Tol MJ, Kroes AC, Schinkel J, Dinkelaar D, Claas EC, Jolvan der Zijde CM, Vossen JM.** Adenovirus infection in padiatric stem cell transplant recipients: increased risk in young children with delayed immune recovery. *Bone Marrow Transplant*.2005 Jul;36(1):39-50.
57. **Van Tol MJ, Claas EC, Heemskerk B, Veltrop-Duits LA, de Brouwer CS, van Vreeswijk T, Sombroek CC, Kroes AC, Beersma MF, de Klerk EP, Egeler RM, Lankester AC, Schilham MW.** Adenovirus infection in children after allogenic stem cell transplantation: diagnosis, treatment and immunity. *Bone Marrow Transplant*. 2005 Mar;35 Suppl 1:S73-6.
58. **Gupta V, Ball SE, Sage D, Ortin M, Freires M, Gordon-Smith ES, Marsh JC.** Marrow transplant from matched unrelated donors for aplastic anaemia using alemtuzumab, fludarabine and cyclophosphamide based conditioning. 2005 Mar;35(5):467-71.

59. Heemskerk B, Lankester AC, van Vreeswijk T, Beersma MF, Claas EC, Veltrop-Duits LA, Kroes AC, Vossen JM, Schilham MW, van Tol MJ. Immune reconstitution and clearance of human adenovirus viremia in pediatric stem-cell recipients. *J Infect Dis.* 2005 Feb 15;191(4):520-30.
60. Seidemann K, Heim A, Pfister ED, Koditz H, Beilken A, Sander A, Melter M, Sykora KW, Sasse M, Wessel A. Monitoring of adenovirus infection in pediatric transplant recipients by quantitative PCR: report of six cases and review of the literature. *Am J Transplant.* 2005 Dec;4(12):2102-8.
61. Lankester AC, Heemskerk B, Claas EC, Schilham MW, Beersma MF, Bredius RG, van Tol MJ, Kroes AC. Effect of ribavirin on the plasma viral DNA load in patients with disseminating adenovirus infection. *Clin Infect Dis.* 2004 Jun;38(11):1521-5.
62. Bruno B, Zager RA, Boeckh MJ, Gooley TA, Myerson DH, Huang ML, Hackman RC. Adenovirus nephritis in hematopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation.* 2004 Apr;77(7):1049-57.
63. Gavin PJ, Katz BZ. Intravenous ribavirin treatment for severe adenovirus disease in immunocompromised children. *Pediatrics.* 2002 Jul;110(1Pt1)e9.
64. Shayan K, Saunders F, Roberts E, Cutz E. Adenovirus enterocolitis in pediatric patients following bone marrow transplantation: report of 2 cases and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med.* 2003 Dec;127(12):1615-8.
65. Fioriti D, Degener AM, Mischitelli M, Videtta M, Arancio A, Sica S, Sora F, Pietropaolo V. BKV infection and hemorrhagic cystitis after allogeneic bone marrow transplant. *Int J Immunopharmacol.* 2005 Apr-Jun;18(2):309-16.
66. Walls T, Hawrami K, Ushiro-Lumb I, Shingadia D, Saha V, Shankar AG. Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation: is treatment always necessary? *Clin Infect Dis.* 2005 May 1;40(9):1244-9. Epub 2005 Mar.
67. Dominguez O, Rojo P, de Las Heras S, Folgueira D, Contreras JR. Clinical presentation and characteristics of pharyngeal adenovirus infections. *Pediatr Infect Dis J.* 2005 Aug;24(8):733-4.
68. Gupta V, Ball SE, Sage D, Ortin M, Freires M, Gordon-Smith EC, Marsh JC. Marrow transplants from matched unrelated donors for aplastic anaemia using alemtuzumab, fludarabine and cyclophosphamide based conditioning. *Bone Marrow Transplant.* 2005 Mar;35(5):467-71.
69. Amrolia PJ, Muccioli-Casadei G, Yvon E, Huls H, Sili U, Wieder ED, Bollard C, Michalek J, Ghetie V, Heslop HE, Molldrem JJ, Rooney CM, Schlinder J, Vitetta E, Brenner MK. Selective depletion of donor alloreactive T cells without loss of antiviral or antileukemic responses. *Blood.* 2003 Sept 15;102(6):1605.
70. Comar M, D'Agaro P, Andolina M, Maximova N, Martini F, Tognon M, Campello C. Hemorrhagic cystitis in children undergoing bone marrow transplantation: a putative role for simian virus 40.

Transplantation. **2004** Aug 27;78(4):544-8.

Abstracts und Kongreßbeiträge:

- **Feuchtinger T, Einsele H, Schumm M, Luecke J, Greil J, Niethammer D, Lang P.** Adenovirus Specific T-Cells After Allogenic Stem Cell Transplantation and Large Scale Isolation for Adjuvant Immunotherapy. *Blood*.**2002**;100(11):215A.
- **Feuchtinger T, Einsele H, Hamprecht K, Schumm M, Luecke J, Greil J, Niethammer D, Lang P.** Regeneration of Adenovirus specific T-Cells in Children After Allogenic Atem Cell Transplantation and Efficient Generation of CD4+ and CD8+ T-Cells for Specific Adoptive Immunotherapy. *Bone Marrow Transplantation*.**2003**;31:209.
- **Feuchtinger T, Hamprecht K, Einsele H, Bock T, Luecke J, Neuhauser F, Schumm M, Greil J, Niethammer D, Lang P.** Cummulative Incidence of Adenovirus Infection in Children Following Allogenic Stem Cell Transplantation According to Donor Type, Graft Manipulation and Adenovirus Specific T-Cell Reconstitution. *Bone Marrow Transplantation*.**2004**;33:47.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in folgenden Originalarbeiten:

- **Feuchtinger, Luecke J, Hamprecht K, Richard C, Handgretinger R, Schumm M, Greil J, Bock T, Niethammer, Lang P.** Detection of adenovirus specific T – cells in children with adenovirus infection after allogenic stem cell transplantation. *Br J Haematol*.**2005** Feb;128(4):503-9.

Danksagung

Diese Arbeit entstand im Zeitraum zwischen Februar 2002 und Dezember 2003 unter der Anleitung von Dr. Tobias Feuchtinger, dem ich an dieser Stelle herzlich für seine Unterstützung und seinen Einsatz besonders während des experimentellen Teils dieser Arbeit danke.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. D. Niethammer, danke ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem dem KMT Labor Forschung, das mir bei meinen Versuchen immer wieder mit Rat und Tat zur Seite stand und mir die Benutzung der Geräte freundlich gewährte.

CURRICULUM VITAE

Name	LÜCKE
Vorname	Julia
Geburtsdatum	21/10/1979 in TÜBINGEN
Eltern	Eva und Dr. Jürgen Lücke

Ausbildung:

1986-1990	Grundschule Winkelwiese/ Waldhäuser Ost in Tübingen
1990-1999	Keplergymnasium Tübingen
1999	Abitur
Seit 2000	Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen
03.05.2006	3. Staatsexamen

Praktika:

1999	3 Monate Pflegedienst in der Kinderklinik Tübingen 1 Monat Pflegedienstpraktikum am Hôpital St. Antoine in Paris, Frankreich
2000	1 Monat Pflegedienstpraktikum am Evelyn Hospital in Cambridge, England
2002	1 Monat Famulatur im Hôpital Villeneuve – St Georges in Paris, Frankreich
2003/2004	3 Monate Famulatur am Red Cross Childrens Hospital in Kapstadt, Südafrika

Freizeit:

Judo 2.DAN, Trainer C Lizenz
Mehrfache Teilnahme an „Jugend forscht“, 1999: 2. Platz Bundeswettbewerb im Fachbereich Chemie
Klavier, Violine