

# **Posttransplantationslymphoproliferative Erkrankungen nach Herztransplantation im Kindesalter**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Rüblinger, Lucie Alexandra  
aus Seeheim-Jugenheim

Giessen, 2015

Aus dem Hessischen Kinderherzzentrum  
Abteilung für Kinderkardiologie und angeborene Herzfehler  
Leiter Prof. Dr. D. Schranz  
Justus- Liebig- Universität Giessen

Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin  
des Universitätsklinikums Giessen und Marburg

Gutachter: PD Dr. J. Bauer

Gutachter: Prof. Dr. S. Gattenlöhner

Tag der Disputation: 12.10.2016

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>6</b>
1.1. Entwicklung der Herztransplantation.....	6
1.2. Herztransplantation im Kindesalter .....	6
1.3. Komplikationen nach Herztransplantation im Langzeitverlauf.....	7
1.4. Posttransplantationslymphoproliferative Erkrankungen (PTLD).....	8
1.4.1. Einführung .....	8
1.4.2. Rolle des Epstein- Barr- Virus (EBV) .....	8
1.4.2.1. Erstbeschreibung und klinische Präsentation .....	8
1.4.2.2. Infektionsweg und Immunantwort beim Immunkompetenten .....	9
1.4.2.3. EBV unter Immunsuppression.....	10
1.4.3. Immunsuppressive Therapie nach Herztransplantation .....	10
1.4.4. Risikofaktoren für die Entwicklung einer PTLD .....	11
1.4.5. Histologische Klassifikation der PTLD.....	12
1.4.6. Klinische Symptomatik und Stadieneinteilung.....	15
1.4.7. Therapie der PTLD .....	18
1.5. Zielsetzung der Arbeit .....	21
<b>2. Methode</b> .....	<b>22</b>
2.1. Überblick Herztransplantation am Kinderherzzentrum Giessen.....	22
2.2. Patientenkollektiv .....	23
2.2.1. Einschlusskriterien .....	23
2.2.2. Ausschlusskriterien .....	23
2.3. PTLD- Patienten.....	24
2.3.1. Tumorhistologie .....	24
2.3.2. PTLD- Therapie.....	25
2.3.3. Verlaufsbeschreibung.....	25
2.4. EBV- Assoziation.....	26
2.4.1. Messung der EBV- Viruslast im peripheren Blut .....	26
2.4.2. EBV- Nachweis im Tumor .....	27
2.5. Evaluation von Risikofaktoren .....	27
2.5.1. EBV und CMV .....	27
2.5.2. Rejektionen .....	28
2.6. Immunsuppressive Therapie am Kinderherzzentrum Giessen .....	28
2.7. Statistische Analyse .....	29
2.8. Ethikantrag .....	29

<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>30</b>
3.1. Inzidenz.....	30
3.2. Demographische Daten.....	31
3.2.1. Geschlechtsverteilung.....	31
3.2.2. Alter bei HTX.....	31
3.3. Auftreten der PTLD.....	32
3.3.1. Zeitlicher Abstand zwischen HTX und PTLD.....	32
3.3.2. Lokalisation der PTLD.....	33
3.4. Histologie.....	34
3.4.1. EBV- positive PTLD.....	37
3.4.1.1. EBER-1 in situ- Hybridisierung.....	37
3.4.1.2. Höhe der EBV- Viruslast zum Zeitpunkt der PTLD.....	38
3.5. Verlauf und Therapie.....	38
3.5.1. Stadium bei Diagnosestellung.....	38
3.5.2. Therapie.....	40
3.6. Überleben.....	41
3.6.1. PTLD- Rezidive.....	42
3.6.2. Überleben in der PTLD- Gruppe vs. Vergleichsgruppe.....	43
3.7. EBV und CMV in der PTLD- Gruppe vs. Vergleichsgruppe.....	45
3.7.1. Serologischer EBV- Status der Transplantempfänger.....	45
3.7.2. EBV- Genomnachweis im Blut.....	46
3.7.3. Serologischer CMV- Status.....	47
3.7.3.1. CMV- Status der Spender.....	47
3.7.3.2. CMV- Status der Transplantempfänger.....	47
3.7.4. CMV- Infektion.....	48
3.8. Akute Organabstoßungen in der PTLD- Gruppe vs. Vergleichsgruppe.....	48
3.9. Therapie mit ATG/ OKT-3 in der PTLD- Gruppe vs. Vergleichsgruppe.....	49
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>50</b>
4.1. PTLD- Inzidenz.....	50
4.2. Patientenalter als Risikofaktor.....	52
4.3. EBV- Serostatus und Viruslast.....	53
4.4. Weitere Risikofaktoren.....	54
4.5. Klinische Manifestation und Histologie.....	56
4.5.1. Lokalisation.....	56
4.5.2. Histologische Befunde.....	57
4.6. Therapie.....	58

4.7. Outcome.....	59
4.7.1. Remissionsraten und Überleben der PTLD- Patienten .....	59
4.7.2. Langzeitüberleben der PTLD- Patienten/ Vergleichspatienten .....	60
4.8. Limitationen und Ausblick.....	61
<b>5. Zusammenfassung (deutsch/ englisch).....</b>	<b>63</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>67</b>
<b>7. Tabellen-/ Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>69</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>71</b>
<b>9. Anhang .....</b>	<b>85</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1. Entwicklung der Herztransplantation**

Mit Beginn des 20. Jahrhunderts stieg in der Medizin das Interesse für Organtransplantationen an, was zunächst zu experimentellen Organverpflanzungen im Tierversuch führte. In ihrem Werk „The transplantation of veins and organs“ beschrieben A. Carrel und C. Guthrie 1906 die erste Herztransplantation beim Hund (1). Ab 1960 entwickelten N.E. Shumway und R. Lower durch Hundeherztransplantationen ihre bis heute angewandte Operationstechnik (2). Die weltweit erste Herztransplantation von Mensch zu Mensch erfolgte 1967 durch Christian Barnard in Kapstadt (3), die erste Transplantation bei einem Kind wenige Tage später in New York (4). Beide Transplantempfänger verstarben in den ersten postoperativen Tagen.

Nachdem die erste Phase der Herztransplantation in den 60er Jahren durch viele Misserfolge aufgrund schwer beherrschbarer Komplikationen wie z.B. akute Organabstoßungen gekennzeichnet war, kam es nach Einführung des Calcineurin-Inhibitors Ciclosporin A (CSA) im Jahr 1982 zu einem raschen Anstieg der Transplantationszahlen weltweit. Nach Angaben der International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) wurden zwischen 1982 und 2011 über 100.000 Herzen transplantiert (5). Die weltweite erste neonatale Herztransplantation gelang 1985 bei einem Neugeborenen mit hypoplastischem Linksherzsyndrom durch Bailey et al (6).

### **1.2. Herztransplantation im Kindesalter**

Nach Angaben der ISHLT wurden 2012 weltweit 512 Kinder unter 18 Jahren herztransplantiert, was 12% aller Herztransplantationen darstellt. Die medianen Überlebenszeiten nach pädiatrischer Herztransplantation liegen aktuell abhängig vom Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation zwischen 12,9 und 20,6 Jahren. Dabei weisen Patienten nach Transplantation im Säuglingsalter im Durchschnitt die längsten Überlebenszeiten auf (7). Die Lebenserwartung nach Transplantation ist bei Kindern besser als bei Erwachsenen, obwohl pädiatrische Transplantempfänger eine höhere frühe Mortalität zeigen (8). Seit Beginn der Kinderherztransplantationsprogramme nahm das Langzeitüberleben kontinuierlich zu, was vor allem auf der Verbesserung des früh- postoperativen Überlebens beruht (9).

Die Hauptindikation zur Herztransplantation (HTX) besteht in der therapierefraktären Herzinsuffizienz, wobei im Kindesalter zwischen Cardiomyopathien und angeborenen Herzfehlern unterschieden werden muss, bei denen die Herzinsuffizienz auch einen

singulären Ventrikel oder einen rechten Ventrikel als Systemventrikel betreffen kann. Daneben kann auch die Anatomie eines komplexen Vitium cordis zur primären Transplantation führen. Kongenitale Herzfehler, bei denen die Transplantation auch heute noch als primäre Therapie angesehen wird, sind funktionell univentrikuläre Herzfehler, bei denen eine univentrikuläre Palliation aufgrund zusätzlicher Anomalien (z.B. Koronaranomalien, Stenosen oder Insuffizienzen der Atrioventrikulären Klappen oder Semilunarklappen des Systemventrikels) nicht in Frage kommt (10). In den Anfangsjahren der Kinderherztransplantation wurden viele Kinder mit hypoplastischem Linksherz, unabhängig von zusätzlichen Fehlbildungen, einer primären Transplantation zugeführt. Mit Etablierung der chirurgischen univentrikulären Palliation im Sinne einer Fontan- Zirkulation nahm die Zahl der transplantierten Kinder mit hypoplastischen Linksherzsyndrom ab. Dies geschah auch in Anbetracht des Mangels an Spendeorganen. Aktuell steigt der Anteil der älteren Patienten nach univentrikulärer Palliation, die im Langzeitverlauf sekundär eine Herztransplantation benötigen (9, 11).

Unter den Cardiomyopathien überwiegt mit ca. 80% die dilatative Cardiomyopathie (DCM), deren jährliche Inzidenz im Kindesalter mit 0,57/ 100.000 angegeben wird (12, 13). Seltener liegen restriktive (ca. 10%) oder hypertrophe (ca. 7%) Formen der Cardiomyopathie vor. Ca. 40% der Kinder mit symptomatischer Erkrankung werden entweder herztransplantiert oder versterben innerhalb von zwei Jahren (14).

Ein relativ kleiner, aber zunehmender Anteil unter den Transplantationen im Kindesalter machen Re- Transplantationen aus. Aktuell wird dieser mit ca. 7% aller Transplantationen angegeben, wobei als häufigste Ursache die chronische Transplantatvaskulopathie gilt (15).

### **1.3. Komplikationen nach Herztransplantation im Langzeitverlauf**

Mit Verbesserung der Lebenserwartung nach Organtransplantation stehen Komplikationen im Langzeitverlauf immer mehr im Vordergrund. Im ersten Jahr nach der Transplantation stellen Graftversagen, akute Abstoßungen und Infektionen die häufigsten Ursachen für Mortalität dar (7), im Langzeitüberleben gelten vor allem die Transplantatvaskulopathie als chronische Abstoßung sowie Erkrankungen, die mit der lebenslangen Immunsuppression einhergehen, als limitierende Faktoren (16). Hierzu zählen die chronische Niereninsuffizienz und maligne Erkrankungen. Die Angaben zur Inzidenz von malignen Erkrankungen nach Organtransplantation variieren zwischen 1-20% je nach Typ des transplantierten Organs und anderen Risikofaktoren (17, 18).

Posttransplantationslymphoproliferative Erkrankungen (PTLD) machen im Kindesalter den Großteil aller Tumorerkrankungen nach solider Organtransplantation aus und werden unter Punkt 1.4 näher beschrieben. Daneben spielen vor allem Tumore der Haut, v.a. Plattenepithelkarzinome, Kaposi Sarkome und Melanome sowie urologische und gynäkologische Tumore, z.B. der Vulva und Cervix, eine Rolle. Des Weiteren werden Nierenzellkarzinome oder Tumore des hepatobiliären Systems beschrieben, vereinzelt auch Leukämien oder Hirntumore (19-21).

## **1.4. Posttransplantationslymphoproliferative Erkrankungen (PTLD)**

### **1.4.1. Einführung**

PTLD wurden ab 1968 zunächst als „reticulum cell sarcomas“ oder „Pseudotumore“ beschrieben (22-24). Es wurde bereits vermutet, dass das erhöhte Risiko für Malignome/ Lymphome nach Organtransplantation entweder auf einer direkten Wirkung der Immunsuppression oder auf einer indirekten Wirkung der immunsuppressiven Therapie durch Infektionen mit onkogenen Viren beruht (22). Starzl et al prägten 1984 den Begriff PTLD (25). Der genaue Mechanismus der Entstehung einer PTLD ist bis heute nicht vollständig geklärt. Die durch die immunsuppressiven Medikamente künstlich geschwächte Immunabwehr führt zu einer erhöhten Infektanfälligkeit und mangelnder Infektionskontrolle. Durch eine Infektion mit onkogenen, lymphotropen Viren kann die Proliferation und maligne Entartung von lymphoiden Zellen induziert werden. Eines dieser Viren ist das Epstein- Barr- Virus, das mit der Entwicklung lymphoproliferativer Erkrankungen assoziiert ist (26-28). Die bei der PTLD proliferierende Lymphozytenpopulation besteht zunächst meist aus polymorphen, polyklonalen Zellen, aus denen durch Mutation und Selektion monomorphe und monoklonale maligne Lymphome entstehen können. Der Begriff PTLD bezeichnet somit eine klinisch und histologisch heterogene Gruppe von Lymphomen, die häufig, aber nicht zwingend, mit dem Epstein- Barr- Virus (EBV) assoziiert sind (29).

### **1.4.2. Rolle des Epstein- Barr- Virus (EBV)**

#### **1.4.2.1. Erstbeschreibung und klinische Präsentation**

Das Epstein- Barr- Virus ist ein humanpathogenes, lymphotropes Virus, das den Gamma- Herpesviren zugeordnet wird. Es ist ubiquitär verbreitet mit einer weltweiten Seroprävalenz von 90-95% bei Erwachsenen, wobei die überwiegende Durchseuchung bereits in der frühen Kindheit geschieht (30). 1964 wurde das Epstein- Barr- Virus in

kultivierten Burkitt- Lymphom- Zellen entdeckt (31) und in den darauffolgenden Jahren als Erreger der infektiösen Mononukleose identifiziert (32). Abgesehen vom Burkitt- Lymphom wurde EBV mit der Entwicklung mehrerer anderer Tumore wie Nasopharynxkarzinom, Hodgkin- Lymphom, Magenkarzinom oder HIV- assoziierten Non- Hodgkin- Lymphom in Zusammenhang gebracht (33).

EBV- Infektionen bieten bei gesunden, nicht immunsupprimierten Menschen ein breites Spektrum an klinischen Verläufen. Im frühen Kindesalter verläuft die Primärinfektion beim Gesunden meist als subklinische Infektion oder milde Infektion der oberen Atemwege, während sich bei einer Primärinfektion im Jugend- oder jungen Erwachsenenalter das klassische Bild einer infektiösen Mononukleose mit Fieber, Tonsillitis, Lymphadenopathie und Hepatosplenomegalie entwickeln kann (34, 35).

#### **1.4.2.2. Infektionsweg und Immunantwort beim Immunkompetenten**

Die Übertragung von EBV findet hauptsächlich oral über Speichel statt, wobei die Schleimhäute des Oropharynx als Eintrittspforte dienen. EBV infiziert vor allem B- Lymphozyten, aber auch Makrophagen, natürliche Killerzellen, T- Lymphozyten und glatte Muskelzellen (36, 37). Neben der oralen Infektion via Tröpfchen sind auch EBV- Infektionen durch Blutprodukte, Transplantation von Knochenmark oder solide Organe beschrieben (38, 39).

Die initiale Infektion der B- Lymphozyten vollzieht sich durch die Bindung eines spezifischen viralen Glykoproteinkomplexes des EBV- Kapsids an das B- Zell- Oberflächenantigen CD21, wodurch es zur Fusion zwischen Virus und B- Zelle kommt (40, 41). Nach Aufnahme des Virus in die Zelle dominiert in der frühen Infektion die lytische Phase mit Virusgenom- Replikation, Freisetzung von infektiösen Virionen und Lyse der Wirtszelle. Ein großes Spektrum an viralen Proteinen wird in dieser Phase exprimiert (30). Im immunkompetenten Individuum startet nun die Immunabwehr, die hauptsächlich auf einer durch CD8+- zytotoxische T- Lymphozyten vermittelten zellulären Antwort beruht (42). Gleichzeitig wird auch eine humorale Antwort initiiert, die zur Antikörperproduktion sowohl gegen lytische als auch latente EBV- Proteine (anti- ENBA-1, anti- gp350, anti- VCA) führt. Trotz kompetenter Immunantwort erreicht EBV regelhaft eine Persistenz in einigen Wirtszellen, speziell in B- Gedächtniszellen, in denen das Virus episomal vorliegt (43). Durch wiederkehrenden Wechsel der latenten Phase in die lytische Phase mit Virusreplikation werden wieder vermehrt virale Proteine exprimiert, die zur Erkennung der infizierten Zelle durch das Immunsystem und zur nachfolgenden Lyse durch EBV- spezifische zytotoxische T- Zellen führen. Das

gesunde Immunsystem erreicht dabei eine ständige Balance zwischen EBV- infizierten B- Zellen und der zytotoxischen T- Zell- Antwort und verhindert trotz lebenslanger Viruspersistenz Krankheitssymptome und maligne Entartung durch ungehemmte Proliferation (30). Bei immunkompetenten Patienten liegt dabei ein relativ konstanter Anteil latent EBV- infizierter B- Zellen vor (44).

#### **1.4.2.3. EBV unter Immunsuppression**

Unter immunsuppressiver Therapie nach Organtransplantation ist vor allem die T- Zell- Antwort des Immunsystems supprimiert, was zur Imbalance zwischen latenter EBV- Infektion und T- Zell- vermittelter Kontrolle führt. Im peripheren Blut kann eine signifikant erhöhte Anzahl latent infizierter B- Zellen nachgewiesen werden, was mit einem erhöhten Risiko für lymphoproliferative Erkrankungen assoziiert wurde (45, 46). Auf dem Boden einer durch EBV- stimulierten und unzureichend kontrollierten Proliferation von B- Lymphozyten kann zunächst die Frühform einer PTLD („early lesion“, siehe unten) entstehen. In diesem Stadium gehen die Zellen aus unterschiedlichen B- Zell- Klonen hervor und sind in der Regel mit EBV infiziert. Diese zunächst poly- oder oligoklonalen polymorphen Proliferationen können sich zu monomorphen, monoklonalen Populationen entwickeln, in denen sowohl EBV- positive als auch EBV- negative Zellen vorliegen können. Die klonale Vielfalt wird während der biologischen Entwicklung des Tumors durch Mutation, Selektion und (Mikro-) Umgebungseinflüsse eingeschränkt, sodass eine hochmaligne monomorphe PTLD entstehen kann (47).

#### **1.4.3. Immunsuppressive Therapie nach Herztransplantation**

Zur Verhinderung der Graftabstoßung ist nach Herztransplantation eine lebenslange medikamentöse Immunsuppression erforderlich. Einheitliche Therapieempfehlungen für die immunsuppressive Therapie nach Herztransplantation im Kindesalter bestehen nicht. Nach Daten der ISHLT wird die Langzeittherapie aktuell am häufigsten mit einer Kombination aus Tacrolimus und Mycophenolat mofetil (MMF) durchgeführt. Grundsätzlich erfolgt üblicherweise eine Kombinationstherapie mit einem Calcineurin- Inhibitor wie CSA oder Tacrolimus und einem Zellzyklus- Inhibitor (Antimetabolit) wie Azathioprin oder MMF. mTOR- Inhibitoren (mTOR= mammalian Target of Rapamycin), z.B. Everolimus oder Sirolimus, finden bei Kindern nach HTX derzeit noch eher selten Verwendung (48). Aufgrund ihrer antiproliferativen Eigenschaften werden bei Patienten mit PTLD Vorteile durch Einsatz von mTOR- Inhibitoren beschrieben (49-52).

Kortikosteroide werden hochdosiert vor allem in der ersten Phase nach Transplantation eingesetzt, in der das Abstoßungsrisiko am größten ist. Innerhalb von sechs bis zwölf Monaten nach HTX werden Steroide in vielen Zentren beendet und die Erhaltungstherapie steroid- frei durchgeführt (53, 54). Im Langzeitverlauf werden nach Möglichkeit nur noch akute Organabstoßungen mit einem Steroidstoß behandelt (55). Letztlich wird die immunsuppressive Therapie jedoch individuell an den einzelnen Patienten angepasst, abhängig von Verträglichkeit, Begleiterkrankungen, Abstoßungsrisiko, Compliance etc. (56). Perioperativ erfolgt oftmals zusätzlich zur hochdosierten Steroidtherapie eine sogenannte Induktionstherapie, bei der eine schnelle Reduktion der Lymphozytenzahl als Abstoßungsschutz erreicht werden soll. Dies spielt insbesondere bei sensibilisierten Patienten mit erhöhtem Abstoßungsrisiko, z.B. durch präformierte HLA- Antikörper, eine Rolle. Daneben kann durch eine Induktionstherapie der Einsatz nephrotoxischer Calcineurin- Inhibitoren in der frühen postoperativen Phase teilweise vermindert oder verzögert werden (55). Zur Induktion werden zum einen T- Zell- depletierende Medikamente wie Antithymozytenglobulin (ATG) eingesetzt (56, 57), zum anderen werden Interleukin- 2- Rezeptor- Antagonisten wie Basiliximab oder Daclizumab verwendet, die frühpostoperative Abstoßungen verhindern sollen (58).

#### **1.4.4. Risikofaktoren für die Entwicklung einer PTLD**

Neben EBV als Hauptrisikofaktor werden in der Literatur viele andere Einflussfaktoren diskutiert. Unbestritten ist der Einfluss der Immunsuppression auf das PTLD- Risiko, wobei der Stellenwert und die Wirkung der verschiedenen immunsuppressiven Medikamente im Einzelnen kontrovers bewertet werden. Aktuell gehen viele Autoren aufgrund der abweichenden Ergebnisse bezüglich des Einflusses einzelner Immunsuppressiva eher davon aus, dass vor allem die Intensität der Immunsuppression das PTLD- Risiko beeinflusst und weniger das einzelne Medikament an sich (59-62).

Das Risiko für das Auftreten einer PTLD variiert abhängig vom transplantierten Organ, wobei das höchste Risiko nach Transplantation von Lunge und Intestinum besteht, das niedrigste nach Nierentransplantation. Das Risiko für Patienten nach Herztransplantation liegt dabei im mittleren Bereich (63-67). Das verhältnismäßig hohe Risiko nach Herz-/ Lungen- sowie Darmtransplantation wird vor allem durch die intensivere Immunsuppression erklärt.

Auch Abstoßungsepisoden werden als Risikofaktoren für eine PTLD beschrieben, da sie mit einer zumindest vorübergehenden Intensivierung der Immunsuppression

verbunden sind. Zelluläre Rejektionen werden, je nach histologischem Grad und/ oder klinisch- hämodynamischer Bedeutung, mit einem oralen oder intravenösen Steroidbolus behandelt. Bei schweren Rejektionen kommt teilweise auch ATG zum Einsatz, um eine rasche Lymphopenie herbeizuführen. Therapieoptionen für humorale Abstoßungen bestehen in der Gabe von Immunglobulinen und Rituximab sowie Plasmapherese oder Immunabsorption (55).

Infektionen mit dem Cytomegalievirus (CMV) werden in einigen Studien ebenfalls mit der Entwicklung einer PTLD in Zusammenhang gebracht (68, 69), in anderen Studien wiederum gehen CMV- Seronegativität oder CMV- Infektionen nicht mit einem erhöhten PTLD- Risiko einher (61, 70, 71).

#### **1.4.5. Histologische Klassifikation der PTLD**

Da die PTLD eine heterogene Gruppe von lymphatischen Tumoren darstellt und etliche Besonderheiten im Vergleich zu den klassischen Non- Hodgkin- Lymphomen (NHL) besitzt, wurde 2008 durch die WHO (World Health Organisation) eine eigenständige histologische Klassifikation entwickelt (siehe Tabelle 1). Diese berücksichtigt das breite Spektrum von frühen Läsionen über polymorphe Formen bis hin zu monomorpher PTLD und auch die Hodgkin- oder Burkitt- Lymphom- ähnliche PTLD. Trotz Heterogenität handelt es sich per Definition bei jedem lymphoiden Tumor nach solider Organtransplantation oder Knochenmarktransplantation um eine PTLD. Unterschieden werden nach der WHO- Klassifikation vier Hauptgruppen: early lesions, polymorphe PTLD, monomorphe PTLD und Hodgkin- disease oder Hodgkin- like PTLD (72).

In den meist benignen „early lesions“ finden sich EBV- positive oligo- oder polyklonale Zellproliferationen, die noch kein infiltrierendes Wachstum zeigen. Die zugrundeliegende Gewebestruktur bleibt somit meist noch erhalten. Die Zellen der „early lesions“ zeigen entweder einen „immunoblastischen Zelltyp“ (infectious mononucleosis like PTLD) oder einen „Plasmazell- Phänotyp“, der der normalen Zellarchitektur lymphatischen Gewebes entspricht (plasmacytic hyperplasia early lesion PTLD). Die frühen Läsionen sind somit rein histologisch nicht von einer reaktiven Zellproliferation bei Immungesunden zu unterscheiden und müssen sich auch nicht zwingend zu einem höhergradigen Lymphom entwickeln (73).

Die polymorphe PTLD unterscheidet sich von den frühen Läsionen hauptsächlich durch infiltrierendes Wachstum, was bei nodalen Tumoren die Aufhebung der normalen Lymphknotenarchitektur bedeutet. Bei extranodalen Proliferationen ist die Abgrenzung

sowohl zur early lesion als auch zur monomorphen PTLD schwieriger. Als polymorphe PTLD wird ein Tumor in diesen Fällen dann bezeichnet, wenn er destruierend wächst, aber nicht alle histopathologischen Kriterien eines Lymphoms erfüllt.

Liegen alle histopathologischen Kriterien eines klassischen Non- Hodgkin- Lymphoms (NHL) vor, handelt es sich per Definition um eine monomorphe PTLD. Sie wird nach dem Lymphom, das sie histologisch nachahmt, benannt, was meistens einem B- Zell- Lymphom entspricht. Mit Abstand am häufigsten findet man in dieser Gruppe das diffus- großzellige B- Zell- Lymphom (DLBCL), seltener die Burkitt- like PTLD.

Die Gruppe der Hodgkin- Tumore oder Hodgkin- ähnliche PTLD kann prinzipiell auch zu den monomorphen PTLD gerechnet werden, wird aber aufgrund ihrer histologischen und klinischen Merkmale separat aufgeführt (72-74).

T- Zell- Neoplasien kommen unter den monomorphen PTLD ebenfalls vor, sind aber wesentlich seltener als B- Zell- Neoplasien (75).

Die Einteilung in EBV-positive und EBV- negative PTLD beruht auf dem Nachweis von viralen Genprodukten des Epstein- Barr- Virus in den Tumorzellen, in der Regel am Paraffinmaterial, wobei als Nachweismethode der Wahl die EBER-1- in situ- Hybridisierung benutzt wird (76). Im Kindesalter sind lediglich 10-15% der PTLD EBV- negativ. Bei Erwachsenen finden sich häufiger EBV- negative PTLD, die meist als späte PTLD mit langem Abstand zur Transplantation auftreten (17, 77-79). Ein höheres Patientenalter zum Zeitpunkt der Transplantation wird dabei als ein Risikofaktor für eine spät auftretende PTLD beschrieben (80).

**Tabelle 1.** Histologische Klassifikation der PTLD. Entwicklung durch die WHO 2008 (72), modifiziert nach (62)

Kategorie	Morphologie und Immunphänotyp
Early lesions <ul style="list-style-type: none"> <li>• Plasmacytic hyperplasia</li> <li>• Infectious mononucleosis- like lesions</li> </ul>	Zellarchitektur intakt; Mischung aus polyklonalen B- und T- Zell- Immunblasten und Plasmazellen; typischerweise EBV +
Polymorphic PTLD	Zellarchitektur aufgehoben; volles Spektrum an lymphatischen Zellpopulationen unterschiedlichen Reifegrades; oft EBV +
Monomorphic PTLD <ul style="list-style-type: none"> <li>• B- cell neoplasms               <ul style="list-style-type: none"> <li>• DLBCL</li> <li>• Burkitt lymphoma</li> <li>• Plasma cell Myeloma</li> <li>• Plasmacytoma- like lesion</li> <li>• Other subtypes</li> </ul> </li> <li>• T- cell neoplasms /NK- cell neoplasms</li> </ul>	Zellarchitektur aufgehoben; klassische histopathologische Kriterien nach WHO für Non Hodgkin Lymphome (NHL) erfüllt; Phänotyp abhängig vom NHL- Subtyp; EBV- Positivität variabel
Classical Hodgkin lymphoma- type PTLD	Zellarchitektur aufgehoben; histopathologische Kriterien für klassisches Hodgkin Lymphom nach WHO erfüllt

#### **1.4.6. Klinische Symptomatik und Stadieneinteilung**

Die Symptome einer PTLD sind aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation und des Schweregrads der Erkrankung sehr variabel und somit unspezifisch, was die Diagnosestellung erschwert. Das klinische Spektrum der lymphoproliferativen Erkrankung umfasst asymptomatische Verläufe, organspezifische Symptome, eine klassische B- Symptomatik, aber auch fulminante Verläufe bei disseminierter Organinfiltration mit Multiorganversagen. In solchen Fällen ist die PTLD schwierig von einer akuten Rejektionskrise oder einer Sepsis abzugrenzen, so dass die Diagnose manchmal erst postmortem gestellt werden kann. Nach Daten der Pediatric Heart Transplant Study (PHTS) sind nach pädiatrischer Herztransplantation am häufigsten der Gastrointestinaltrakt, die Lunge und cervikale Lymphknoten von einer PTLD betroffen (18).

Die Stadieneinteilung der PTLD erfolgt nach der St. Jude- (Murphy) Klassifikation für NHL im Kindesalter. Sie wurde erstmals 1980 von S. Murphy et al. am St. Jude Children`s Research Hospital beschrieben (81). Bis heute wird diese Einteilung der klinischen Stadien bei Non- Hodgkin- Lymphomen im Kindesalter verwendet.

Eine Ausnahme unter den PTLD bildet diesbezüglich die Hodgkin- like PTLD, die nach der klassischen Stadieneinteilung für Hodgkin- Lymphome nach Ann- Arbor klassifiziert wird (82).

Tabelle 2 und Tabelle 3 geben die Stadieneinteilung nach St. Jude bzw. Ann Arbor wieder.

**Tabelle 2.** St. Jude- Klassifikation für NHL im Kindesalter, modifiziert nach (81, 83)

<b>Stadium I</b>	Vorliegen eines einzelnen extranodalen Tumors oder Befall einer Lymphknotenregion; Abdomen und Mediastinum ausgeschlossen
<b>Stadium II</b>	Vorliegen eines extranodalen Tumors mit Beteiligung der regionalen Lymphknoten; <b>oder</b> Vorliegen von zwei oder mehr Tumoren oder befallenen Lymphknoten auf einer Seite des Zwerchfells; <b>oder</b> primärer Tumor des Gastrointestinaltrakts mit oder ohne Lymphknotenbeteiligung
<b>Stadium III</b>	Vorliegen extranodaler Tumore oder befallener Lymphknoten auf beiden Seiten des Zwerchfells; <b>oder</b> primärer intrathorakaler Befall (Mediastinum, Pleura; Lunge); <b>oder</b> ausgedehnter primärer intra-abdomineller Befall; <b>oder</b> jeder paraspinaler oder epiduraler Tumor
<b>Stadium IV</b>	Befall des Knochenmarks oder des ZNS

**Tabelle 3.** Stadieneinteilung der Hodgkin Lymphome nach Ann- Arbor- Klassifikation (82), modifiziert nach (84)

<b>Stadium I</b>	Befall einer Lymphknotenregion <b>oder</b> Vorliegen eines extranodalen Herdes
<b>Stadium II</b>	Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells <b>oder</b> Vorliegen lokalisierter extranodaler Herde mit Befall einer oder mehrerer Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells
<b>Stadium III</b>	Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen beiderseits des Zwerchfells <b>oder</b> Befall lokalisierter Herde und Lymphknoten beiderseits des Zwerchfells
<b>Stadium IV</b>	Disseminierter Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe mit oder ohne Lymphknotenbefall
<b>A</b>	Ohne B-Symptomatik (definierte Allgemeinsymptome)
<b>B</b>	<b>Mit B- Symptomatik:</b> Nachtschweiß, Fieber > 38°C, Gewichtsverlust, Leistungsminderung

### 1.4.7. Therapie der PTLD

Für die Therapie der PTLD gibt es bisher aufgrund der Heterogenität der Erkrankung und der vergleichsweise geringen Fallzahlen keine einheitlichen Therapiestandards oder Leitlinien. Aktuell gelten bei Kindern die Reduktion der Immunsuppression und die Gabe des monoklonalen CD20- Antikörpers Rituximab, zum Teil verbunden mit einer (low dose-) Chemotherapie, als wichtigste Therapiemodalitäten (17, 74, 85, 86).

Allgemein wird als erster Therapieschritt die Reduktion der Immunsuppression empfohlen. Dies geschieht unter der Annahme, dass durch die Stärkung der körpereigenen (T- Zell-) Immunabwehr gegen EBV- induzierte Lymphoproliferationen eine Regression des Tumors erreicht werden kann. Diese Strategie zur Therapie der PTLD wurde schon 1984 von Starzl et al beschrieben und seitdem von zahlreichen Autoren bestätigt (25, 87-89). Als schwierig gestaltet sich dabei die Balance zwischen erwünschter Reduktion der Immunsuppression einerseits und erhöhtem Abstoßungsrisiko andererseits. Die Erfolgsrate einer alleinigen PTLD- Therapie durch Reduktion der Immunsuppression wird in Studien an Kindern nach solider Organtransplantation (SOT) variabel mit 30-70% angegeben (61, 90-92). Bei EBV- negativer PTLD erscheint eine Reduktion der Immunsuppression per se nicht sinnvoll.

Das seit 1997 für die Therapie von malignen Lymphomen bei Erwachsenen zugelassene Rituximab ist ein monoklonaler IgG- Antikörper, der an das Membranprotein CD20 bindet. CD20 wird auf allen B- Lymphozyten in verschiedenen Reifestufen (ab pro- B- Lymphozyt bis hin zu reifen B- Zelle) exprimiert und findet sich auch auf der Zelloberfläche entarteter B- Zellen. Über CD20 werden Funktionen des Zellzyklus, Proliferation und Zelldifferenzierung reguliert (93). Das Ansprechen der CD20- positiven PTLD auf Rituximab wurde in den letzten Jahren mehrfach belegt (94-96), sodass es als Standardelement in die Therapie einer CD20- positiven PTLD aufgenommen wurde. Rituximab in Kombination mit einer (low dose-) Chemotherapie bewies sich in mehreren Studien sowohl an erwachsenen Patienten als auch an Kindern als erfolgreich (97-99). Die Chemotherapie ist bei Erwachsenen meist Anthrazyklin- basiert (sogenanntes CHOP- Schema: Cyclophosphamid, Doxorubicin oder Daunorubicin, Vincristin oder Oncovin und Prednisolon). Bei Kindern wurde die NHL- Therapie für Kinder mit B- Zell- NHL ohne Immunsuppression der entsprechenden Studiengruppen in den USA und der BFM- Gruppe als Grundlage genommen und für die PTLD modifiziert (98, 100). Die Erfahrungen von D. Burkitt mit der erfolgreichen Behandlung der endemischen (afrikanischen) EBV- positiven Burkitt-

Lymphome mit Cyclophosphamid allein waren die entscheidende Basis. In den am besten geprüften Schemata für Kinder sind Steroide, Cyclophosphamid und mittelhoch-dosiertes Methotrexat enthalten (98).

Die deutsche pädiatrische PTLD- Studiengruppe begann 2005 mit einer klinischen Phase II Studie (Ped- PTLD 2005- Pilot: Prospective Study of Diagnosis and Treatment of Posttransplant Lymphoproliferative Disease after Solid Organ Transplantation in Children), die als Therapie zunächst eine dreiwöchige Monotherapie mit Rituximab und anschließend entweder eine Fortsetzung der Rituximab- Monotherapie oder bei fehlendem Ansprechen eine Erweiterung um eine Chemotherapie nach festgelegtem Schema beinhaltet (100). Die Ergebnisse dieser Studie wurden bisher noch nicht publiziert.

Besonderheiten gelten für die Therapie bestimmter PTLD- Typen (74): Die Hodgkin Lymphom- PTLD wird nach entsprechenden Protokollen für Morbus Hodgkin mit einer Kombinationschemotherapie und ggf. auch Bestrahlung therapiert. Für eine PTLD vom Burkitt- Lymphom Typ und für T- Zell- PTLD werden in der Regel aggressivere Chemotherapie- Regimes angewendet (75, 101, 102). Eine PTLD mit cerebralem Befall, die mit einer schlechten Prognose einhergeht (103), kann mit Rituximab und Chemotherapie systemisch und intrathekal sowie mit ZNS- Bestrahlung behandelt werden (104-106).

Eine chirurgische Tumoresektion kommt nur in ausgewählten Fällen bei lokalen Tumoren, bei Rezidiven oder Komplikationen, z.B. Darmperforation bei abdomineller PTLD, in Frage. Die Radiatio gehört im Kindesalter mit Ausnahme der Hodgkin- Lymphom- bzw. Hodgkin- like PTLD und der cerebralen PTLD nicht zur first- line Therapie (17).

In den Bereich der neueren Immuntherapien fällt die Behandlung mit EBV- spezifischen cytotoxischen T- Lymphozyten (CTL), die in aufwendigen Verfahren aus peripherem Blut gewonnen und in Speziallaboratorien aufgearbeitet werden. Sie können sowohl autolog als auch allogene transplantiert werden. Bisher wurden sie erfolgreicher bei PTLD- Patienten nach Knochenmarktransplantation als bei PTLD- Patienten nach solider Organtransplantation eingesetzt (107-109).

Neben der Immun- oder T- Zelltherapie besteht ein theoretischer Therapieansatz in der antiviralen Therapie (110). Ganciclovir oder Foscavir inhibieren in vitro erfolgreich die lytische EBV- DNA- Vermehrung, besitzen jedoch keinen Effekt auf latent infizierte B- Lymphozyten. Da die Mehrheit der transformierten B- Lymphozyten der PTLD nicht der lytischen Phase unterliegen, ist dieser Ansatz umstritten. Klinisch zeigen sich keine wesentlichen therapeutischen Effekte. Durch die zusätzliche Gabe von Argininbutyrat sowie von Bortezomib, einem Proteasom- Inhibitor, konnte ein Wechsel von der latenten in die lytische Phase induziert werden, womit die Empfänglichkeit der B- Zellen für eine antivirale Therapie mit Ganciclovir erhöht werden konnte (111, 112). Bisher liegen jedoch erst Phase- I Studien zur antiviralen Therapie bei PTLD- Patienten vor.

### **1.5. Zielsetzung der Arbeit**

Aufgrund der verbesserten Überlebensraten nach Organtransplantation im Kindesalter stehen vermehrt Langzeitkomplikationen im Vordergrund, wie z.B. die Entwicklung maligner Erkrankungen, insbesondere der PTLD.

Giessen ist eines der größten Kinderherztransplantationszentren in Deutschland. 1988 erfolgte hier deutschlandweit die erste Herztransplantation bei einem Säugling (113). Seit 26 Jahren werden am Kinderherzzentrum Giessen Herztransplantationen an Kindern durchgeführt, wovon ca. die Hälfte der Kinder (51%) im Alter unter einem Jahr transplantiert wurde.

21 von 196 im Kinderherzzentrum betreuten HTX- Patienten entwickelten bis einschließlich 2014 eine PTLD. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Patienten hinsichtlich ihrer Erkrankung untersucht mit dem Ziel Häufigkeit, Lokalisation, Pathologie, Behandlung und Outcome zu definieren.

Bekannt bzw. in der Literatur diskutierte Risikofaktoren für die Entwicklung einer PTLD wie Alter der Patienten bei Transplantation, EBV- und CMV- Status vor der Transplantation sowie EBV- und CMV- Infektionen/ Reaktivierungen im Verlauf, Anzahl akuter Organabstoßungen etc. wurden in dem beschriebenen PTLD- Patientenkollektiv eruiert. Die Daten dieser Patienten bezüglich der beschriebenen Risikofaktoren wurden mit den Daten der herztransplantierten Kinder ohne Tumorerkrankung verglichen, um orientierend Risikofaktoren für die PTLD in unserer Patientengruppe zu identifizieren.

## 2. Methode

### 2.1. Überblick Herztransplantation am Kinderherzzentrum Giessen

Zwischen 1988 und 2014 wurden im Kinderherzzentrum Giessen 189 Patienten herztransplantiert. Sieben Patienten sind an die hiesige Transplantationsambulanz angebunden, die ursprünglich in einer auswärtigen Klinik transplantiert wurden. Innerhalb des untersuchten Zeitraums von 1988- 2014 wurden somit insgesamt 196 HTX- Patienten im Kinderherzzentrum Giessen betreut.

Im Rahmen der Behandlung von Erwachsenen mit angeborenen Herzfehlern (EMAH) wurden auch erwachsene Patienten im Kinderherzzentrum (re-) transplantiert. Bis 2014 erhielten sieben Patienten eine Re- Transplantation, ein Patient bereits eine Re- Re- Transplantation. Einige im Kinderherzzentrum Giessen transplantierte Patienten werden mittlerweile in anderen Kliniken betreut oder stellen sich nur noch gelegentlich zur Mitbeurteilung in der Transplantationsambulanz vor.

In diese Arbeit wurden nur Patienten eingeschlossen, die im Kindesalter zwischen 0- 18 Jahren herztransplantiert wurden, mindestens drei Monate nach Transplantation überlebten und durchgehend in Giessen betreut wurden (siehe Ein- und Ausschlusskriterien).

Die Patienten stellen sich in der Regel ca. alle drei (bis sechs) Monate in der Transplantationsambulanz vor. In der Frühphase nach Herztransplantation sowie bei besonderer Indikation (z.B. Spiegelschwankungen der immunsuppressiven Medikamente) oder bei Komplikationen werden die Patienten individuell in kürzeren Intervallen vorstellig.

In der ambulanten Kontrolle erfolgt neben der körperlichen Untersuchung, der Echokardiographie und Elektrokardiographie regelmäßig eine Blutentnahme, bei der auch routinemäßig eine EBV- und CMV- Diagnostik durchgeführt wird. In bestimmten Abständen erfolgen weitere Kontrollen wie Urinuntersuchungen, Sonographie, Röntgen etc. Zur kardialen Verlaufskontrolle nach Herztransplantation werden MRT- Untersuchungen und Herzkatheter durchgeführt.

Im Falle einer onkologischen Erkrankung werden die Patienten sowohl ambulant als auch stationär in der Kinderonkologie des Universitätsklinikums Giessen betreut.

## **2.2. Patientenkollektiv**

Die in 2.1 beschriebenen Patienten wurden für die vorliegende Arbeit nach bestimmten Kriterien ausgewählt. Die Daten dieser Patienten wurden retrospektiv erfasst. Zur Verfügung standen Patientenakten der Abteilungen Kinderkardiologie und pädiatrische Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Giessen. Die Patientenakten lagen sowohl in Papierform als auch elektronisch in Form der Datenspeicherungssysteme des Universitätsklinikums (KAOS, KAOS- KIK und KIS- Data) vor. Des Weiteren besteht eine abteilungsinterne Transplantationsdatenbank, die Daten aller im Kinderherzzentrum für eine Transplantation gelisteten Patienten und der bereits transplantierten Patienten enthält.

Es wurden Befunde, Arztbriefe und Verlaufsvermerke der behandelnden Ärzte eingesehen. Alle Patientendaten lagen zum Zeitpunkt der Datenerfassung bereits vor. Zusätzliche Datenerhebungen im Sinne von Untersuchungen oder Patientenbefragungen wurden nicht durchgeführt. Insbesondere konnte zur Bestimmung des EBV- und CMV- Status der Patienten auf vorhandene Befunde aus den routinemäßigen Blutuntersuchungen im Rahmen der regulären Ambulanzkontrollen zurückgegriffen werden.

Die Patienten wurden über einen Zeitraum von 26 Jahren untersucht, wobei als Follow-up die Zeit zwischen HTX und Ende des Beobachtungszeitraums (31.12.2014) bzw. zwischen HTX und Tod des Patienten bestimmt wurde.

### **2.2.1. Einschlusskriterien**

In diese Arbeit wurden alle Patienten eingeschlossen, die zwischen 06/ 1988 und 09/ 2014 im Alter von 0-18 Jahren am Kinderherzzentrum Giessen herztransplantiert wurden, mindestens drei Monate nach Transplantation überlebten und sich seitdem regelmäßig in der Transplantationsambulanz vorstellten.

### **2.2.2. Ausschlusskriterien**

Aus der Arbeit ausgeschlossen wurden Patienten, die zum Zeitpunkt der (ersten) HTX älter als 18 Jahre alt waren. Weiterhin wurden Patienten ausgeschlossen, die nicht durchgehend im hiesigen Kinderherzzentrum betreut wurden. Dies betraf sowohl Patienten, die zwar an die hiesige Transplantationsambulanz angebunden sind, aber ursprünglich in einer anderen Klinik transplantiert wurden, als auch Patienten, die in Giessen transplantiert, aber nicht durchgehend im hiesigen Zentrum behandelt wurden. Zur Sicherung möglichst lückenloser Daten wurden mindestens jährliche

Ambulanzkontrollen als Einschlusskriterium festgelegt. Ein weiteres Ausschlusskriterium bestand im Versterben innerhalb der ersten drei Monate nach Transplantation, da ein minimaler Beobachtungszeitraum von drei Monaten nach Transplantation festgelegt wurde.

### **2.3. PTLD- Patienten**

Der PTLD- Gruppe wurden alle eingeschlossenen Patienten dieser Arbeit zugeordnet, die im Beobachtungszeitraum von 1988 bis einschließlich 2014 eine PTLD entwickelten. Auch im Verlauf verstorbene Patienten wurden dabei erfasst. Als Vergleichsgruppe dienten alle anderen Patienten, die bis Ende 2014 tumorfrei blieben. Auch hier wurden verstorbene Patienten untersucht, sofern die Patienten nicht bereits in den ersten Monaten nach Transplantation verstarben.

#### **2.3.1. Tumorhistologie**

Die WHO teilt die PTLD in vier histologische Hauptgruppen ein. Die monomorphe PTLD umfasst nach dieser Einteilung auch die Burkitt- like PTLD und die (seltene) T- Zell- PTLD.

In dieser Arbeit wurden die PTLD aus klinischer Sicht in sechs Gruppen unterteilt, sodass die Burkitt- like PTLD und die T- Zell- PTLD einer eigenen (Unter-) Gruppe zugewiesen wurden. Mit monomorpher PTLD ist im Folgenden das am häufigsten vorkommende diffus- großzellige B- Zell- Lymphom (DLBCL) gemeint.

Early lesions wurden in der Arbeit nicht erfasst.

Histologische Einteilung der PTLD in dieser Arbeit:

1. Monomorphe B- Zell PTLD (diffus- großzelliges B- Zell- Lymphom, DLBCL)
2. Polymorphe PTLD
3. Hodgkin- like PTLD
4. Burkitt- like PTLD (Untergruppe der monomorphen B- Zell- PTLD)
5. Monomorphe T- Zell- PTLD
6. Histologie nicht bekannt (keine Tumorbiopsie erfolgt)

### 2.3.2. PTLD- Therapie

An erster Stelle der PTLD- Therapie stand bei allen Patienten die Reduktion der Immunsuppression. Die spezifische Therapie der PTLD wurde in dieser Arbeit in fünf Therapiegruppen eingeteilt:

1. nur Rituximab
2. Rituximab und Chemotherapie
3. Hodgkin- Lymphom Therapie
4. Burkitt- Lymphom Therapie
5. Individualisierte Therapie (ohne festes Schema)
6. Keine spezifische Therapie (nur Reduktion der Immunsuppression)

Eine partielle oder komplette chirurgische Tumorresektion kam nur bei wenigen Patienten in Frage.

Die PTLD- Therapie mit Rituximab und Chemotherapie erfolgte in den Jahren 2005-2012 entsprechend dem Studienprotokoll der deutschen Ped- PTLD Pilot Studie von 2005, in die Patienten bei Einwilligung eingeschlossen wurden.

### 2.3.3. Verlaufsbeschreibung

Die Ereignisse (sogenanntes „Outcome“) der PTLD- Patienten wurden in die Kategorien "komplette anhaltende Remission", "Progress unter Therapie", "therapie-assoziierte Mortalität", "Rezidiv" oder "Zweittumor anderer Ursache" eingeteilt.

Eine komplette Remission (CR) bestand per Definition dann, wenn sich der Tumor nach Therapie zurückbildete, so dass auch in der Bildgebung keine Tumorreste mehr nachgewiesen werden konnten. Als anhaltende komplette Remission wurde eine Remission definiert, die bis zum Ende des Studienzeitraums (12/ 2014) bestand.

In Abgrenzung zum Rezidiv wurde eine erneute PTLD als Zweittumor kategorisiert, wenn eine andere histologische Klassifikation vorlag (z.B. erste PTLD Hodgkin-Lymphom, zweite PTLD monomorphes großzelliges B- Zell- Lymphom). Auch der Wechsel eines EBV- positiven Tumors in einen EBV- negativen Tumor oder umgekehrt galt als Kriterium für einen Zweittumor anstelle eines Rezidivs. Bei einem Wechsel einer zunächst polymorphen in eine monomorphe PTLD konnte nicht in jedem Fall sicher zwischen Rezidiv und Zweittumor unterschieden werden, da es sich sowohl um eine neu aufgetretene, unabhängige Tumorentstehung als auch um eine Entwicklung einer polymorphen Proliferation in einen monomorphen Tumor handeln konnte.

## 2.4. EBV- Assoziation

Neben Häufigkeit des Auftretens, Lokalisation, Histologie, Therapie und Verlauf der PTLD wurde die Assoziation des Tumors zum Epstein- Barr- Virus untersucht. Dies erfolgte zum einen durch die Messung der EBV- Viruslast im Blut der Patienten zum Zeitpunkt der PTLD- Erkrankung und zum anderen durch den histologischen Nachweis des Virus in der Tumorbiopsie.

### 2.4.1. Messung der EBV- Viruslast im peripheren Blut

Die maximale Höhe der EBV- Viruslast wurde zum Zeitpunkt der PTLD- Erstdiagnose bzw. in den drei vorausgehenden Monaten bestimmt.

Gemessen wurde die Kopienzahl der EBV- Genome im peripheren Blut der Patienten mittels PCR (polymerase- chain- reaction). Da die Messungen in den Jahren zwischen 1988 und 2014 in verschiedenen virologischen Laboren durchgeführt wurden, unterschieden sich die Proben hinsichtlich des untersuchten Materials (Vollblut vs. Plasma bzw. Serum) und somit auch der gemessenen Viruslast. Um die Befunde trotzdem bewerten und vergleichen zu können, wurde eine Einteilung in „hohe Viruslast“ versus „niedrige Viruslast“ und negative Ergebnisse vorgenommen (siehe Tabelle 4).

Als Schwellenwert für eine hohe EBV-Viruslast im Vollblut wurde ein Wert  $> 5000$  Kopien/ml Vollblut festgelegt, was einer Definition entspricht, die bereits von anderen Autoren verwendet wurde (114-116). Als Schwellenwert für eine hohe Viruslast im Plasma wurde ein Wert von  $> 100$  Kopien/ml Plasma festgelegt (117).

**Tabelle 4.** Einteilung der EBV- Viruslast in hohe und niedrige Viruslast, getrennt dargestellt für Vollblut (bzw. EDTA- Blut) und Plasma (bzw. Serum)

Probenmaterial	Hohe Viruslast	Niedrige Viruslast
<b>Vollblut (EDTA)</b>	$> 5000$ Kopien/ ml Vollblut	$< 5000$ Kopien/ ml Vollblut
<b>Plasma (Serum)</b>	$> 100$ Kopien/ ml Plasma	$< 100$ Kopien/ ml Plasma

### **2.4.2. EBV- Nachweis im Tumor**

In den vorliegenden Biopsien wurde EBV mittels EBER-1- in situ- Hybridisierung nachgewiesen, was als Standardmethode des EBV- Nachweises in Tumorzellen gilt (73, 76, 118). Bei Nachweis von EBER-1 in der Biopsie wurde die PTLD als EBV- positiv bezeichnet.

EBER-1, ein Genprodukt des Epstein- Barr- Virus in Form kleiner, nicht translaterter RNA, wird bei der Methode der in- situ- Hybridisierung als Ziel- Nukleinsäure verwendet, da es in großer Kopienzahl in allen Zellkernen latent EBV- infizierter Zellen vorliegt. Mittels eines synthetisierten und speziell markierten Nukleinsäurestrangs als „Sonde“ werden Ziel- Nukleinsäuren durch Paarung („Hybridisierung“) sichtbar gemacht.

## **2.5. Evaluation von Risikofaktoren**

Von den in der Literatur diskutierten Risikofaktoren wurden das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der HTX, EBV- und CMV- Infektionen bzw. Reaktivierungen, akute Organabstoßungen sowie die Gabe von T- Zell- depletierenden Medikamenten (ATG/ Okt-3) untersucht. Zur Auswertung der Häufigkeit dieser Ereignisse wurde in der Gruppe der PTLD- Patienten nur der Zeitraum bis zur Erstdiagnose der PTLD betrachtet. Ereignisse, beispielsweise Abstoßungen, die im zeitlichen Verlauf nach der PTLD- Diagnose auftraten, wurden nicht erfasst.

### **2.5.1. EBV und CMV**

Bei allen Patienten wurde der serologische EBV- und CMV- Status vor Transplantation untersucht. Von den Organspendern wurde nur der CMV- Status erfasst, der EBV- Status war in der Regel nicht bekannt. Bei Säuglingen mit positivem Serostatus konnte nicht zwischen mütterlichen Leih- Antikörpern und kindlichen Antikörpern nach bereits durchlaufener Primärinfektion unterschieden werden.

EBV- Infektionen oder Reaktivierungen wurden untersucht, indem erfasst wurde, bei welchen Patienten sich innerhalb des Untersuchungszeitraums EBV- Genome mittels PCR nachweisen ließen. Die Höhe der Viruslast wurde in der PTLD- Gruppe zum Zeitpunkt der Diagnosestellung analysiert (siehe 2.4.1).

### **2.5.2. Rejektionen**

Sowohl bei den PTLD- Patienten als auch in der Vergleichsgruppe wurde die Anzahl der akuten Organabstoßungen untersucht. Erfasst wurden die therapiebedürftigen Rejektionen. Es wurde nicht zwischen zellulären oder humoralen Rejektionen unterschieden. Auch Rejektionen, die sich letztlich in der Myokardbiopsie als humorale Abstoßungen erwiesen, wurden in der Regel zunächst bei Abstoßungsverdacht mit einem Prednisolonstoß und ggf. auch ATG behandelt.

### **2.6. Immunsuppressive Therapie am Kinderherzzentrum Giessen**

Die immunsuppressive Therapie der HTX- Patienten am Kinderherzzentrum Giessen besteht nach Transplantation zunächst aus einer Dreifach- Therapie mit hochdosiertem Prednisolon, Ciclosporin A (CSA) und Azathioprin. Bei akutem Nierenversagen unter CSA- Therapie sowie bei schweren akuten Abstoßungen wird in einzelnen Fällen Antithymozytenglobulin (ATG) verabreicht; auch Antilymphozytenglobulin (ALG) oder Muromonab- CD3 (OKT-3) wurden in den 90er Jahren vereinzelt eingesetzt. Zudem erhalten Patienten mit einem erhöhten Abstoßungsrisiko durch präformierte HLA- Antikörper nach vorausgehenden Operationen und/ oder Bluttransfusionen eine Induktionstherapie mit dem Interleukin- 2 Rezeptor- Antikörper Basiliximab. In früheren Jahren wurde auch vereinzelt Daclizumab verwendet.

Die Steroidtherapie wird während der ersten drei Monate nach Transplantation schrittweise reduziert und beendet. Die Erhaltungstherapie besteht dann in der Regel aus einer dualen Therapie mit einem Calcineurin- Inhibitor (CSA oder Tacrolimus) und einem Antimetaboliten (Azathioprin oder Mycophenolat mofetil (MMF)). Aufgrund des günstigeren Nebenwirkungsprofils wird seit einigen Jahren frühzeitiger nach Transplantation von CSA auf Tacrolimus gewechselt und auch eher MMF als Azathioprin in der Dauertherapie verwendet.

Bei Patienten mit einer dauerhaften renalen Dysfunktion (Glomeruläre Filtrationsrate unter  $70 \text{ ml/ min/ } 1,73 \text{ m}^2$ ) wird üblicherweise der Calcineurin- Inhibitor durch einen mTOR- Inhibitor (Everolimus) ersetzt.

Patienten nach PTLD- Diagnose erhalten eine reduzierte Immunsuppression, meist nur noch eine Monotherapie, entweder mit einem Calcineurin- Inhibitor oder einem mTOR- Inhibitor. Auch wird eine Reduktion der immunsuppressiven Therapie durch eine Senkung der Ziel- Blutspiegel angestrebt, sofern der Patient darunter abstoßungsfrei bleibt.

## **2.7. Statistische Analyse**

Bei metrischen Merkmalen wurde Mittelwert, Median, Standardabweichung und Spannweite (range) berechnet, bei ordinal oder nominal skalierten Merkmalen die absolute und relative Häufigkeit angegeben. Für die Analyse von Häufigkeitsverteilungen wurde der Chi-Quadrat Test bzw. exakter Fisher-Test angewendet, zur univariaten Analyse ANOVA und Wilcoxon-Mann-Whitney Test. Alle Signifikanztestungen erfolgten zweiseitig, wobei  $p < 0,05$  als statistisch signifikant festgelegt wurde. Überlebenszeitanalysen wurden mittels Kaplan-Meier-Methode durchgeführt.

Als statistische Programme wurden Microsoft EXCEL und SPSS verwendet.

## **2.8. Ethikantrag**

Der Antrag zum Forschungsvorhaben am Menschen mit dem Titel „Malignome, insbesondere posttransplantationsproliferative Erkrankungen (PTLD), nach Herztransplantation im Kindesalter“ wurde am 05.02.2015 durch die Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen genehmigt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Inzidenz

In diese Arbeit wurden 133 Patienten anhand der genannten Kriterien eingeschlossen. 63 von 196 im Kinderherzzentrum betreuten HTX- Patienten wurden ausgeschlossen. Davon wurden 26 Patienten nicht durchgehend in der Kinderkardiologie Giessen betreut. 23 Patienten verstarben innerhalb der ersten drei Monate nach Transplantation und vier Patienten erfüllten noch nicht das geforderte minimale Follow- up von drei Monaten nach HTX (Transplantation zwischen Oktober und Dezember 2014). Zehn weitere Patienten wurden ausgeschlossen, da sie zum Zeitpunkt ihrer Transplantation bereits älter als 18 Jahre waren.

21 von 133 eingeschlossenen Patienten (16%) entwickelten innerhalb des Beobachtungszeitraums von 1988 bis 2014 eine PTLD. 84% (112/133) der untersuchten Patienten blieben bis einschließlich Dezember 2014 PTLD- frei und bildeten in der vorliegenden Arbeit die Vergleichsgruppe.

Bezieht man die Anzahl der PTLD- Patienten nicht nur auf die in diese Arbeit eingeschlossenen Patienten, sondern auf alle zwischen 1988 und 2014 im Kinderherzzentrum betreuten HTX- Patienten, so liegt die PTLD- Inzidenz niedriger bei 11% (21 von insgesamt 196 Patienten).

Abhängig vom Zeitpunkt der Evaluation bezogen auf den Abstand zur Transplantation ergaben sich folgende Häufigkeiten: fünf Jahre nach HTX waren 6% der Patienten, die über einen Zeitraum von mindestens fünf Jahren nach HTX beobachtet wurden, an einer PTLD erkrankt (5 von 90). Von den Patienten, die mindestens zehn Jahre nach HTX nachbeobachtet wurden, erkrankten während des zehnjährigen Beobachtungszeitraums 22% (14 von 65).

Bei acht von 21 PTLD- Patienten (38%) kam es innerhalb des Beobachtungszeitraums zu einem Rezidiv der PTLD oder einem Zweittumor. Ein Patient entwickelte dreimalig eine PTLD, womit insgesamt 30 PTLD- Erkrankungsfälle beschrieben werden.

In der PTLD- Gruppe lag die mediane Follow- up Zeit der Patienten bei 12,8 Jahren (1,2 bis 25,1 Jahre), in der Vergleichsgruppe bei 10,5 Jahren (0,4 bis 26,5 Jahre). Die mittlere Follow- up Zeit aller Patienten lag bei 10,8 Jahren.

## **3.2. Demographische Daten**

### **3.2.1. Geschlechtsverteilung**

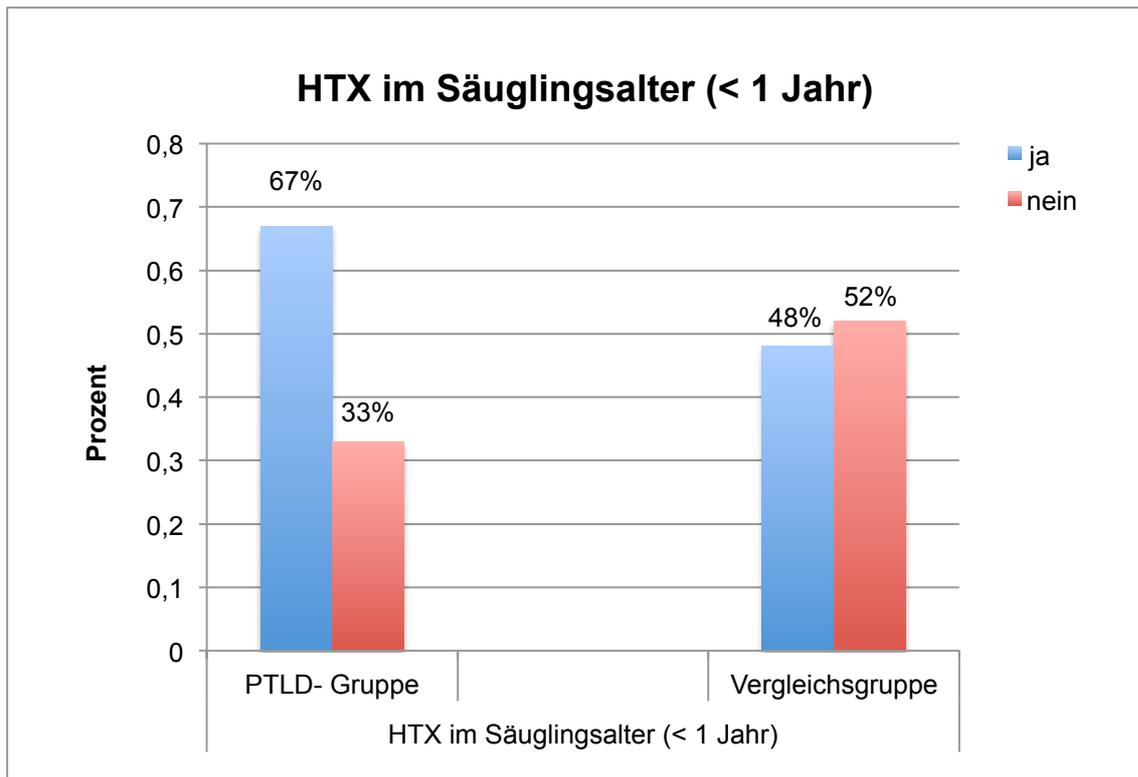
Die geschlechtsspezifische Verteilung zeigte sich in beiden Gruppen ähnlich: jeweils ca. 60% der Patienten waren männlich und ca. 40% weiblich. In der PTLD- Gruppe befanden sich zu 57% Jungen und zu 43% Mädchen, in der Vergleichsgruppe zu 63% Jungen und zu 37% Mädchen.

### **3.2.2. Alter bei HTX**

Die PTLD- Patienten waren zum Zeitpunkt der Transplantation durchschnittlich jünger als die Patienten in der Vergleichsgruppe. Das mediane Alter lag in der Gruppe der PTLD- Patienten bei 0,5 Jahren (0,05 bis 15,6 Jahre), in der Vergleichsgruppe bei 1,3 Jahren (0,01 bis 17,7 Jahre). Ein statistisch signifikanter Unterschied bestand nicht ( $p=0,17$ ).

In der PTLD- Gruppe wurden 67% (14/21) der Patienten im ersten Lebensjahr transplantiert, während in der Vergleichsgruppe nur 48% (54/112) der Transplantationen im Säuglingsalter stattfanden ( $p=0,11$ ) (Abb. 1).

In beiden Gruppen zusammen waren 51% der Kinder (68/133) zum Zeitpunkt der HTX jünger als ein Jahr alt.



**Abbildung 1.** Prozentualer Anteil der Patienten nach HTX im Säuglingsalter (< 1 Jahr) in der PTLD- Gruppe und der Vergleichsgruppe

### 3.3. Auftreten der PTLD

#### 3.3.1. Zeitlicher Abstand zwischen HTX und PTLD

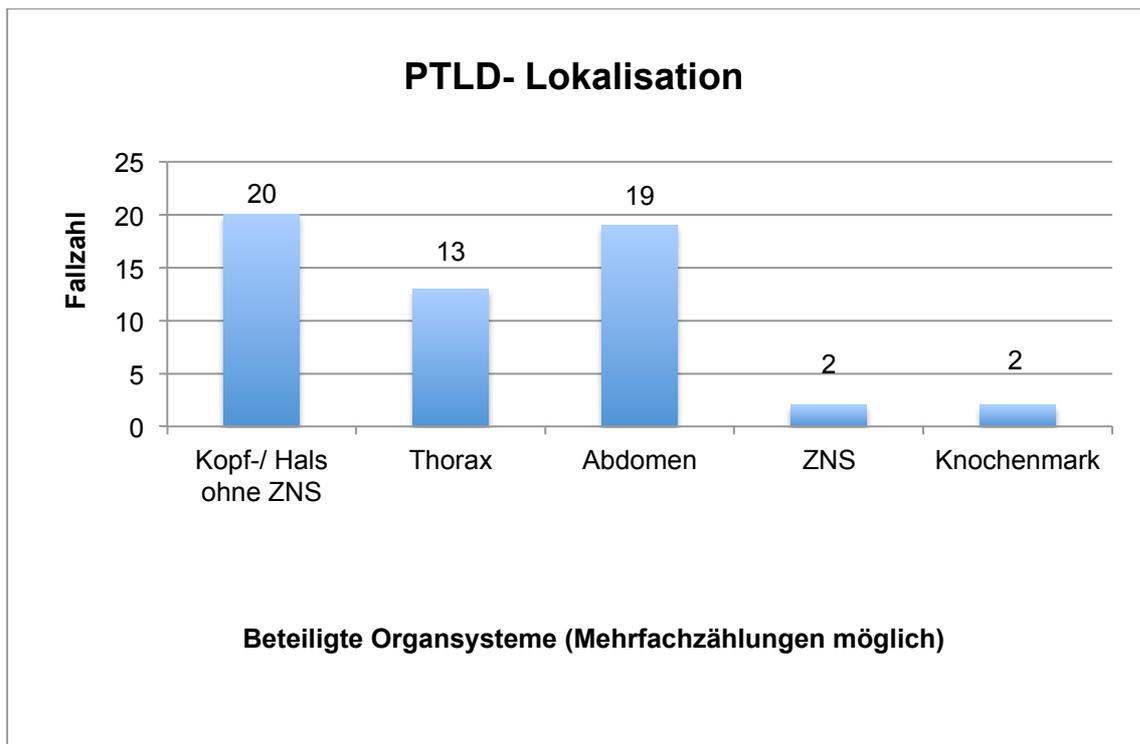
Der Abstand zwischen Herztransplantation und Auftreten der (ersten) PTLD variierte zwischen 0,5 Jahren (minimaler Abstand) und 14,9 Jahren (maximaler Abstand), im Median bestand ein zeitlicher Abstand zwischen HTX und PTLD von 7,2 Jahren.

Der jüngste Patient war zum Zeitpunkt der PTLD- Erstdiagnose 1,6 Jahre alt, der älteste 25,8 Jahre. Das mittlere Alter (Median) lag bei 8,3 Jahren.

Eine Übersichtstabelle zu den im Folgenden beschriebenen Merkmalen der PTLD (Lokalisation, Stadium, Histologie, EBV- Assoziation) ist im Anhang angefügt.

### 3.3.2. Lokalisation der PTLD

Die häufigste Lokalisation der PTLD war mit 67% (20 von 30 Fällen) der Kopf- Hals-Bereich, wobei Tumore des Zentralnervensystems (ZNS) getrennt aufgeführt wurden. In 19 Fällen lag eine Beteiligung des Abdomens vor und in 13 Fällen ein thorakaler Befall. Eine zerebrale PTLD sowie eine Infiltration des Knochenmarks zeigten jeweils nur zwei Patienten (Abb. 2).



**Abbildung 2.** Lokalisation der PTLD: Darstellung der beteiligten Organsysteme, Mehrfachzählungen der PTLD bei multi-lokalem Befall

#### PTLD im Kopf- Hals- Bereich:

In 20 von 30 Fällen (67%) war der Kopf- Hals- Bereich (ohne ZNS) von der PTLD betroffen. Am häufigsten waren cervikale Lymphknoten befallen (n= 18). Bei drei Patienten präsentierte sich die PTLD im Bereich der Tonsillen und bei einem Patienten konnte eine PTLD der Schilddrüse nachgewiesen werden. Die Patienten mit cervikalem Lymphknotenbefall zeigten überwiegend einen multifokalen Lymphknotenbefall mit Lymphom- Nachweis auch in mediastinalen und/ oder abdominellen Lymphknoten. Nur drei Patienten (10%) stellten sich bei Diagnose mit einem isolierten cervikalen Lymphknotenbefall dar.

Abdominelle PTLD:

Fast ebenso häufig wie eine PTLD im Kopf-/ Hals- Bereich fand sich eine abdominelle PTLD (19 von 30 Fällen, 63%). Bei 2/3 der Patienten wurde eine abdominelle Lymphadenopathie nachgewiesen (n=13), der Dünn- oder Dickdarm war bei 1/3 der Kinder (n= 7) betroffen. Die befallenen Lymphknoten konnten (entweder isoliert oder multifokal) mesenterial, paraaortal, im Bereich der Leberpforte, im Bereich des Milzhilus, retroperitoneal oder inguinal dargestellt werden. Zwei Patienten zeigten eine PTLD der Leber, ein Patient eine Beteiligung des Pankreas.

Thorakale PTLD:

Eine intrathorakale PTLD lag bei 13 von 30 Fällen (43%) vor, wobei am häufigsten Lymphknoten des Mediastinums betroffen waren (n= 11). Lediglich drei Patienten zeigten intrapulmonale Herde. Bei allen Patienten mit mediastinalem Lymphknotenbefall fanden sich auch befallene Lymphknoten im Bereich des Halses oder des Abdomens, ein isolierter Befall von mediastinalen Lymphknoten kam nicht vor.

**3.4. Histologie**

Die histologischen Subtypen der PTLD, klassifiziert nach WHO von 2008, wurden getrennt für die 21 PTLD- Erstdiagnosen und für die neun PTLD- Rezidive bzw. Zweittumore untersucht.

Bei den PTLD- Erstdiagnosen fanden sich mit gleicher Häufigkeit zu jeweils 1/3 (jeweils 7/21, 33%) eine monomorphe B- Zell- PTLD (DLBCL) und eine polymorphe PTLD. Bei drei Patienten zeigte sich ein Hodgkin- Lymphom bzw. eine Hodgkin- like PTLD (14%). Jeweils zwei Patienten wiesen eine monomorphe B- Zell- PTLD vom Burkitt- Typ sowie eine monomorphe T- Zell- PTLD auf (jeweils 10%) (Abb. 3).

Der zeitliche Abstand zwischen HTX und Auftreten der (ersten) PTLD variierte zwischen den histologischen Subtypen der PTLD. DLBCL als Ersttumore traten im Median nach 7,2 Jahren auf (0,5- 14,9 Jahren), polymorphe PTLD nach 6,5 Jahren (1,8- 13,3 Jahren). Hodgkin- Lymphome bzw. Hodgkin- like PTLD wiesen einen medianen Abstand von 7,7 Jahren auf (6,6- 14,2 Jahren). Die beiden Burkitt- like PTLD traten nach 10,6 und 11,9 Jahren nach HTX auf, die beiden monomorphen T- Zell- PTLD nach 6,7 und 6,8 Jahren.

Die PTLD- Rezidive bzw. Zweittumore stellten sich am häufigsten (in 4 von 9 Fällen) als monomorphe B- Zell- PTLD (DLBCL) dar. Eine polymorphe PTLD zeigte sich in dieser Gruppe nur bei einem Patienten. Zwei Patienten wiesen als zweite PTLD ein Hodgkin- Lymphom bzw Hodgkin- like PTLD auf (Abb. 4). Burkitt- like PTLD oder T- Zell- PTLD fanden sich in dieser Gruppe nicht. In zwei Fällen erfolgte keine Biopsie (siehe unten).

Die zweite PTLD trat nach einem medianen Abstand zur ersten PTLD von 1,3 Jahren auf (0,9- 11,1 Jahre). Bei sechs von acht Patienten mit Rezidiv bzw. Zweittumor lag als Erstdiagnose eine polymorphe PTLD vor. Zwei von acht Patienten wiesen eine Hodgkin- like PTLD auf.

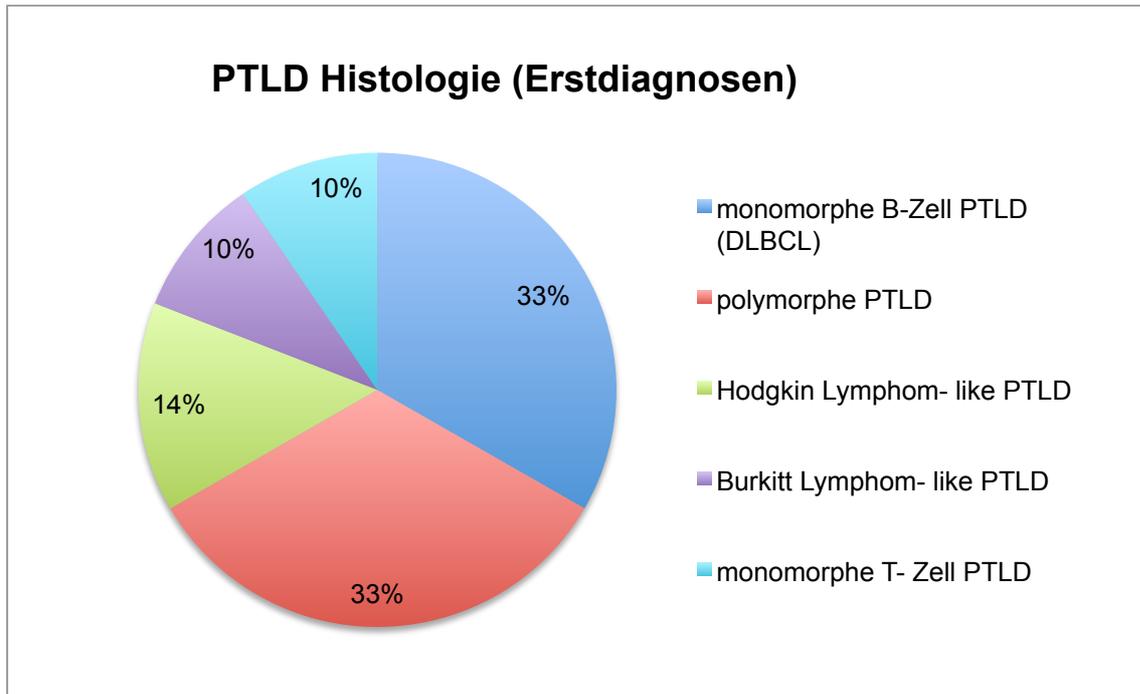
In Tabelle 5 sind für die acht Patienten mit Rezidiv bzw. Zweittumor die histologischen Befunde der jeweils ersten und zweiten PTLD (in einem Fall auch dritten PTLD) im Vergleich dargestellt.

**Tabelle 5.** Vergleich der histologischen Subtypen der PTLD- Rezidive bzw. Zweittumore mit dem histologischen Subtyp der jeweils ersten PTLD.

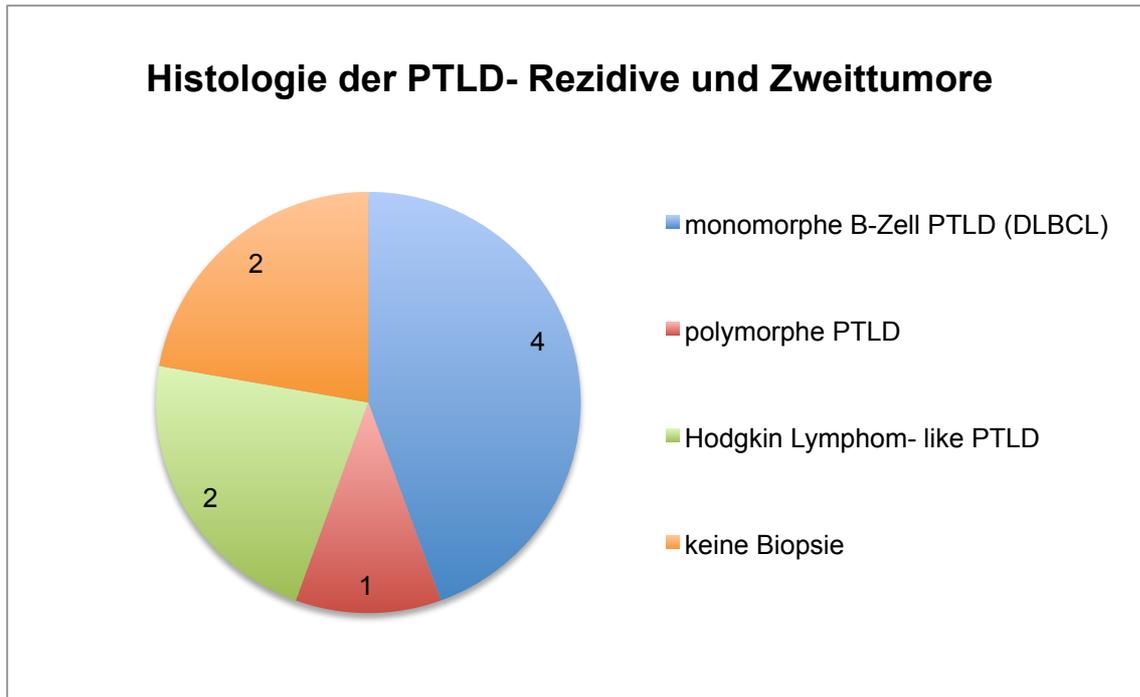
Histologie der ersten PTLD	Histologie der Rezidive bzw. Zweittumore
Polymorph	DLBCL (erstes Rezidiv) Keine Biopsie (zweites Rezidiv)
Polymorph	DLBCL
Polymorph	Hodgkin- like
Hodgkin- like	Polymorph
Polymorph	Hodgkin- like
Hodgkin- like	DLBCL
Polymorph	DLBCL
Polymorph	Keine Biopsie

In zwei der insgesamt 30 PTLD- Fälle wurde die Diagnose nicht bioptisch gesichert. Bei beiden Kindern handelte es sich um Rezidive einer PTLD. In einem Fall wurde die klinische Diagnose eines pulmonalen PTLD- Rezidivs bei einem Patienten gestellt, der ein akutes Lungenversagen (ARDS) mit begleitendem Anstieg der EBV- Viruslast zeigte. Dieser Patient war bereits vier Jahre zuvor an einem PTLD- Rezidiv erkrankt. Aufgrund der Erkrankungsschwere (respiratorische Insuffizienz mit Beatmungspflichtigkeit) wurde der Patient ohne vorherige Biopsie unter der Annahme eines

erneuten PTLD- Rezidivs mit Rituximab behandelt. Bei der zweiten biotisch nicht gesicherten PTLD erschien der klinische und radiologische Verdacht auf ein PTLD- Rezidiv ausreichend, da sich in der Bildgebung innerhalb von weniger als einem Jahr der morphologisch gleiche Tumor nachweisen ließ.



**Abbildung 3.** Prozentuale Verteilung der histologischen Subtypen der PTLD (klassifiziert nach WHO 2008), Darstellung der Ersttumore unter Ausschluss der Rezidive und Zweittumore



**Abbildung 4.** Verteilung der histologischen PTLD- Subtypen der Rezidive und Zweittumore (klassifiziert nach WHO 2008), Darstellung der absoluten Anzahlen (n= 9)

### 3.4.1. EBV- positive PTLD

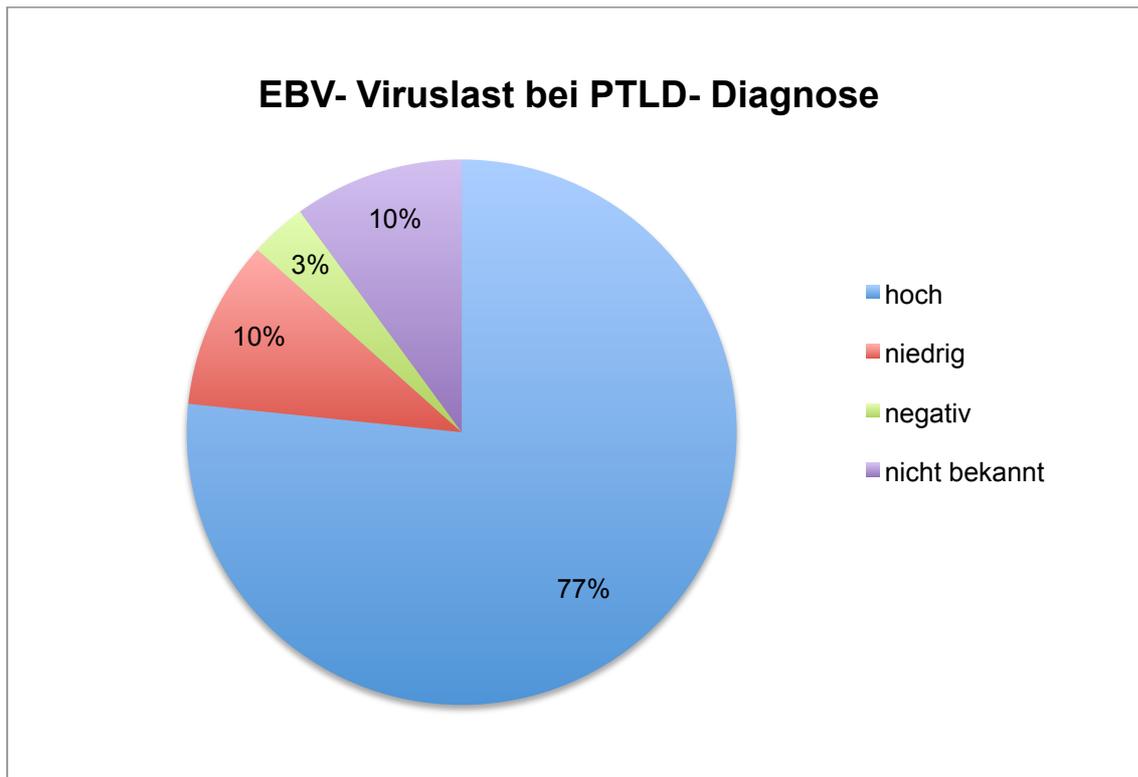
#### 3.4.1.1. EBER-1 in situ- Hybridisierung

Zu 75% (21 von 28 biopsierten Tumoren) konnte EBV mittels EBER-1 in situ-Hybridisierung nachgewiesen werden, nur 14% (4/28) der PTLD waren EBV- negativ. In 11% der Fälle konnte keine Aussage bezüglich des EBV- Nachweises im Tumor getroffen werden. Bei einem Patienten wurde die Diagnose PTLD erst postmortem gestellt und keine erweiterte histologische Untersuchung durchgeführt, bei zwei Patienten war zum Zeitpunkt der retrospektiven Datenerfassung kein vollständiger Biopsiefund vorliegend.

Die EBV- positiven PTLD traten im zeitlichen Verlauf nach HTX signifikant früher auf als die EBV- negativen PTLD. Der mediane zeitliche Abstand zwischen HTX und PTLD- Diagnose betrug bei den EBV- positiven Tumoren 7,7 Jahre (0,5- 14,9 Jahre), bei den EBV- negativen Tumoren 14,2 Jahre (11,9- 14,9 Jahre) (p= 0,008).

### 3.4.1.2. Höhe der EBV- Viruslast zum Zeitpunkt der PTLD

Bei 77% (23/30) der Patienten lag zum Zeitpunkt der PTLD- Diagnose eine hohe EBV- Viruslast vor. Lediglich bei 10% (3/30) zeigte sich eine niedrige Viruslast. Ein Patient (3%) war zum Zeitpunkt der PTLD- Diagnose EBV- negativ. In drei Fällen (10%) war retrospektiv keine EBV- Viruslast zum entsprechenden Zeitpunkt bestimmbar (Abb. 5).



**Abbildung 5.** Prozentuale Verteilung der EBV- Viruslast der Patienten zum Zeitpunkt der PTLD- Diagnose: Einteilung der Viruslast in hoch, niedrig, negativ, nicht bekannt

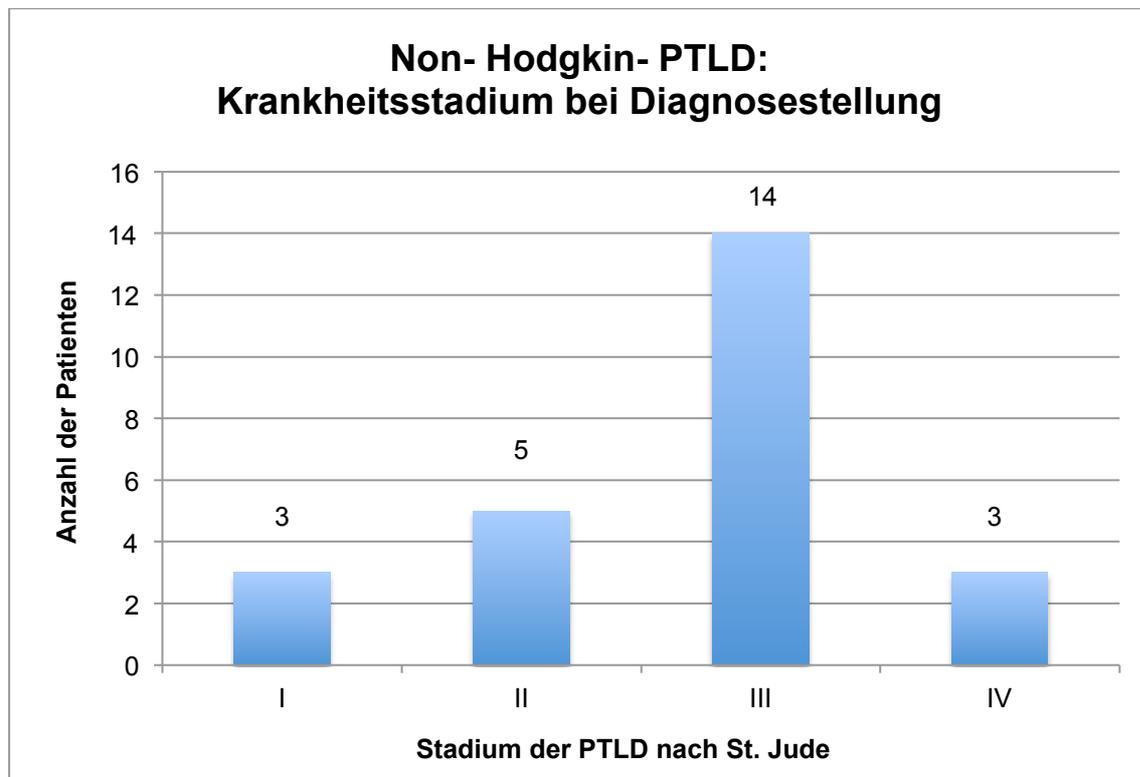
## 3.5. Verlauf und Therapie

### 3.5.1. Stadium bei Diagnosestellung

Die Einteilung des Krankheitsstadiums der PTLD erfolgte bei den Hodgkin- Lymphomen bzw. Hodgkin- like PTLD entsprechend der Ann- Arbor- Klassifikation, bei allen anderen PTLD analog der St. Jude`s Klassifikation für Non- Hodgkin- Lymphome. Die beiden nicht biopsierten PTLD (siehe oben) wurden bezüglich der Stadieneinteilung zu den Non- Hodgkin- Lymphomen gezählt.

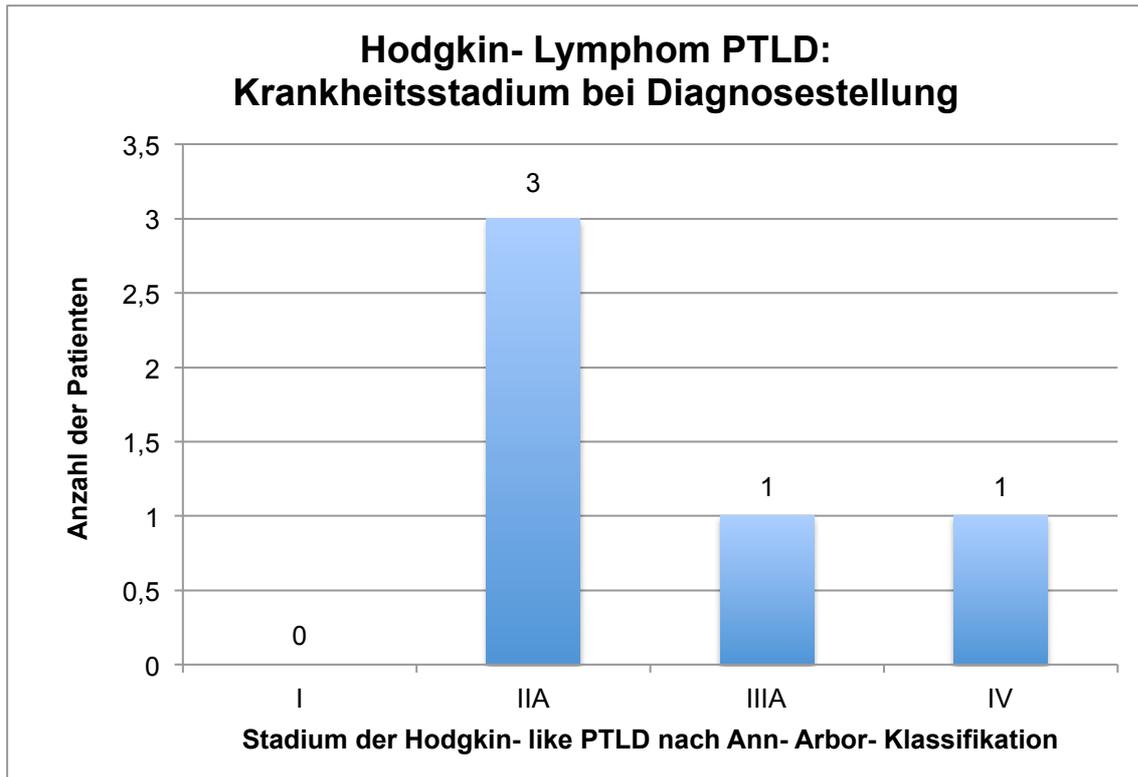
Die Patienten mit Non- Hodgkin PTLD wurden größtenteils im Stadium III diagnostiziert, dies lag bei 14 von 25 Patienten mit NHL vor (56%) (Abb. 6).

Nur 12% (3/25) bzw. 20% (5/25) konnten in früheren Stadien I bzw. II diagnostiziert werden. Bei 12% der Patienten (3/25) lag ein Stadium IV vor, wobei davon zwei Patienten einen cerebralen Befall und ein Patient einen Knochenmarksbefall zeigten. Bei allen drei Patienten mit Stadium IV konnte ein monomorphes DLBCL nachgewiesen werden. Die im Stadium I diagnostizierten PTLD wiesen allesamt eine polymorphe Histologie auf.



**Abbildung 6.** Stadieneinteilung nach St. Jude. Darstellung der PTLD- Patienten mit Ausnahme der Patienten mit Hodgkin- Lymphom PTLD bzw. Hodgkin- like PTLD

Bei fünf von 30 PTLD Fällen wurde ein Hodgkin- Lymphom bzw. eine Hodgkin- Lymphom- like PTLD nachgewiesen. 60% dieser Patienten (3/5) wurden im Stadium IIA nach Ann Arbor diagnostiziert, Stadium I kam nicht vor, Stadium IIIA und Stadium IV mit disseminiertem Befall zeigten jeweils ein Patient (Abb. 7).



**Abbildung 7.** Stadieneinteilung nach Ann Arbor. Darstellung der Patienten mit Hodgkin- Lymphom PTLD bzw. Hodgkin- like PTLD.

### 3.5.2. Therapie

Bei allen Patienten erfolgte an erster Stelle der PTLD- Behandlung eine Reduktion der immunsuppressiven Therapie.

In sechs von 30 Fällen (20%) erfolgte eine chirurgische (Teil-) Resektion, davon in einem Fall eine Komplettresektion. Zu 70% (21/30) wurde eine Tumorbiopsie ohne Resektion durchgeführt.

Die weitere Therapie wird getrennt für Patienten mit Non- Hodgkin- PTLD und Patienten mit Hodgkin- Lymphom bzw. Hodgkin- like PTLD beschrieben.

11 von 25 Non- Hodgkin- PTLD (44%) wurden mit Rituximab als Monotherapie behandelt. In 5 von 25 Fällen (20%) erfolgte eine Kombinationstherapie aus Rituximab und Chemotherapie. In einem Fall wurde eine Chemotherapie ohne Rituximab durchgeführt. Dabei handelte es sich um einen Patienten mit Burkitt- like PTLD, der eine Polychemotherapie nach Burkitt- Lymphom Therapieprotokoll erhielt. Der andere der beiden Burkitt- like PTLD Patienten mit abdominellem Befall konnte nach chirurgischer Komplettresektion nur mit Rituximab behandelt werden.

Vier von 25 Patienten mit NHL- PTLD erhielten eine individualisierte, nicht nach standardisiertem Studienprotokoll erfolgende Therapie. Zwei Patienten mit cerebraler PTLD (DLBCL Stadium IV) wurden individuell mit modifizierter Chemotherapie und Rituximab systemisch und intrathekal therapiert; zusätzlich erhielt einer der beiden Patienten aufgrund fehlender Remission eine Therapie mit EBV- spezifischen cytotoxischen T- Lymphozyten (CTL).

In drei von 25 Fällen erfolgte als ausschließliche Therapie der PTLD eine Reduktion der Immunsuppression. Dabei handelte es sich in zwei Fällen um eine polymorphe PTLD im Stadium I und II. Im dritten Fall lag eine monomorphe T- Zell PTLD vor. Hier wurde jedoch aufgrund einer zusätzlich bestehenden schweren neurologischen Erkrankung mit Mehrfachbehinderung auf Wunsch der Familie auf eine onkologische Therapie verzichtet.

Bei einer Patientin wurde die Diagnose PTLD erst postmortem gestellt.

Neben den beiden zuletzt beschriebenen Patienten, bei denen keine oder nur eine eingeschränkte onkologische Therapie erfolgte, wurde bei einer weiteren Patientin mit einem Zweitumor eine Eskalation der onkologischen Therapie patientenseits abgelehnt bzw. verzögert. Die Patientin erhielt trotz fehlender Remission lediglich Rituximab als Monotherapie.

Von den fünf Patienten mit Hodgkin- Lymphom bzw. Hodgkin- like PTLD erhielten vier Patienten eine Hodgkin- Lymphom Therapie nach Studienprotokoll mit Chemotherapie und Radiatio. Bei einer Patientin wurde auf eigenen Wunsch ausschließlich eine Bestrahlung durchgeführt.

### **3.6. Überleben**

In dieser Arbeit wurden inclusive der rekurrenden Erkrankungen 30 PTLD- Fälle untersucht, bei denen in drei Fällen keine bzw. nur eine eingeschränkte Therapie erfolgte (siehe Punkt 3.5.2).

27 PTLD wurden somit therapiert, wovon in 22 Fällen (81%) eine initiale Remission erzielt werden konnte. Bei einem Patienten mit Rezidiv konnte die zwischenzeitige Remission nicht mit Sicherheit bestätigt werden. In vier Fällen kam es zu einem Progress unter Therapie.

38% der Patienten (8 von 21) entwickelten innerhalb des Beobachtungszeitraums ein Rezidiv oder einen Zweitumor anderer Ursache. Die rekurrenden PTLD werden ausführlicher unter Punkt 3.6.1 beschrieben.

Eine anhaltende komplette Remission nach erster PTLD erreichten 38% der Patienten (8 von 21).

Sechs von 21 Patienten aus der PTLD- Gruppe verstarben (29%), davon fünf Patienten an der Tumorerkrankung und ein Patient an den Komplikationen der Therapie (therapie-assoziierte Mortalität). Von den fünf am Tumor verstorbenen Patienten wurde in einem Fall aufgrund einer Palliativsituation durch eine vorbestehende neurologische Erkrankung auf eine onkologische Therapie verzichtet, in einem anderen Fall wurde die Diagnose PTLD erst post mortem gestellt. Histologisch lag bei drei der verstorbenen Patienten eine monomorphe PTLD (DLBCL) vor, bei zwei Patienten eine T- Zell- PTLD und bei einem Patienten eine polymorphe PTLD.

### **3.6.1. PTLD- Rezidive**

38% der Patienten (8/21) zeigten eine rekurrende PTLD. In fünf von acht Fällen (63%) handelte es sich bei der zweiten PTLD um einen Zweittumor anderer Ursache, da ein Wechsel der Tumorhistologie beobachtet werden konnte (siehe Punkt 2.3.3). In zwei Fällen wurde von einem Rezidiv ausgegangen. In einem Fall konnte keine Unterscheidung zwischen einem Rezidiv und einem Zweittumor getroffen werden, da bei diesem Patienten zunächst eine polymorphe, dann eine monomorphe PTLD bestand, die in beiden Fällen EBV- positiv war.

Bei sieben von acht Patienten mit rekurrender PTLD konnte zunächst eine komplette Remission erreicht werden, bei einem Patienten mit Rezidiv wurde kein sicherer Nachweis einer zwischenzeitigen Remission erbracht.

Von den acht Patienten mit rekurrender PTLD überlebten insgesamt sechs und erreichten bis zum Ende des Studienzeitraums eine anhaltende komplette Remission nach Therapie des Rezidivs bzw. des Zweittumors.

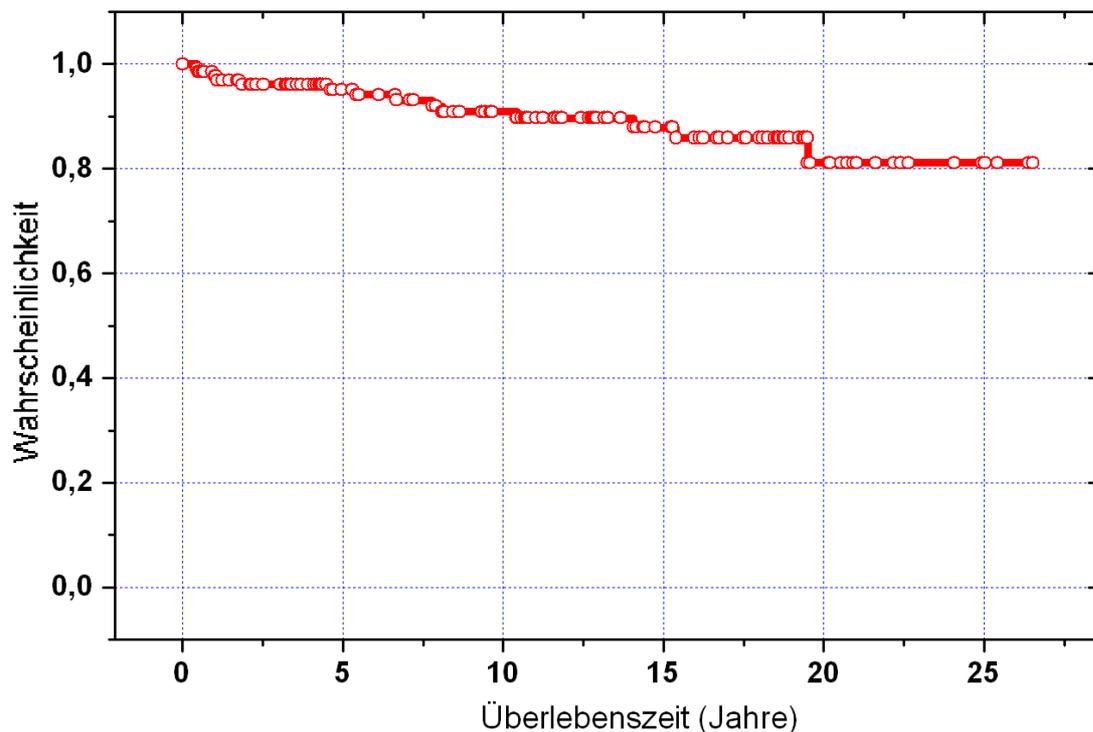
Zusammen mit den Patienten, die ohne Rezidiv/ Zweittumor eine anhaltende komplette Remission erreichten, konnte dies letztlich bei insgesamt 67% aller PTLD- Patienten (14 von 21) erzielt werden.

### 3.6.2. Überleben in der PTLD- Gruppe vs. Vergleichsgruppe

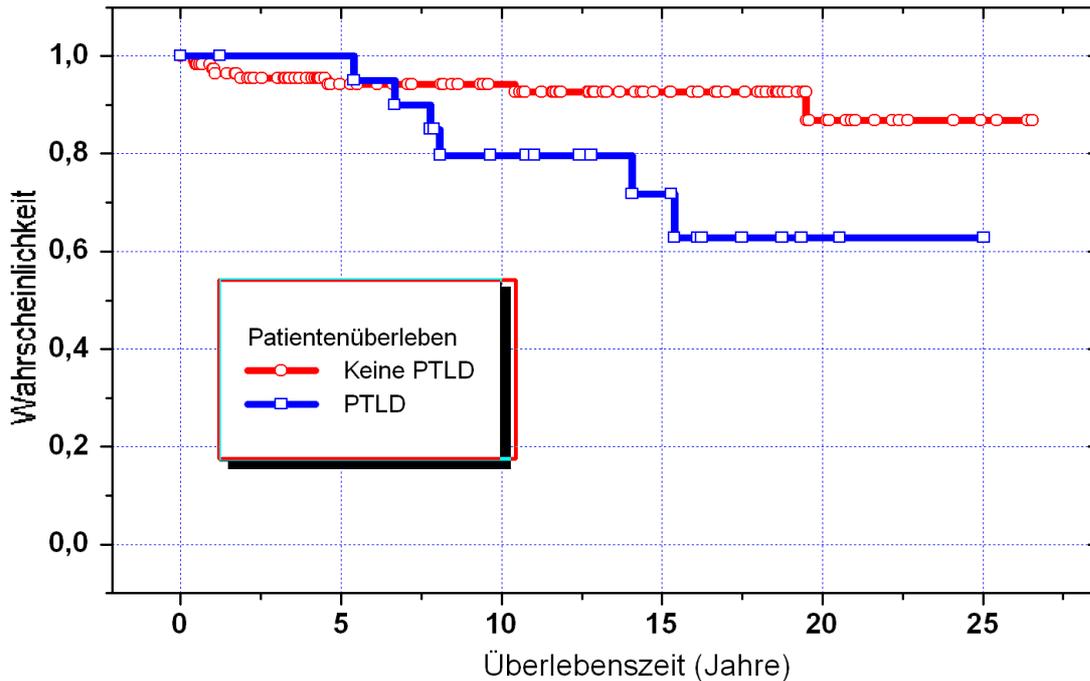
Das Überleben aller in die Arbeit eingeschlossener HTX- Patienten, die die ersten drei Monate überlebten, ist in Abbildung 8 dargestellt. Die 10- Jahres- Überlebenswahrscheinlichkeit liegt bei 90%.

In der Vergleichsgruppe verstarben im Beobachtungszeitraum acht von 112 Patienten (7%), in der PTLD- Gruppe lag die Mortalität deutlich höher bei 29% (siehe 3.6). Die Todesfälle in der Vergleichsgruppe traten im Durchschnitt deutlich früher auf als in der PTLD- Gruppe. In der Vergleichsgruppe bestand ein mittlerer Abstand zwischen HTX und Versterben des Patienten von 1,7 Jahren (Median, 0,4- 10,4 Jahren), in der PTLD- Gruppe von 7,9 Jahren (Median, 5,42- 14,08 Jahren).

Abbildung 9 stellt die Überlebenszeitkurve getrennt für PTLD- Patienten und Patienten ohne PTLD (Vergleichsgruppe) dar.



**Abbildung 8.** Überlebenszeitkurve: wahrscheinliche Überlebenszeit in Jahren, dargestellt für alle in die Arbeit eingeschlossenen Patienten zusammen (mit und ohne PTLD)



**Abbildung 9.** Überlebenszeitkurve: wahrscheinliche Überlebenszeit in Jahren, getrennt dargestellt für die Gruppe der PTLD- Patienten und die Vergleichsgruppe

Wie in Abbildung 9 dargestellt, fällt das Überleben der PTLD- Patienten erst fünf Jahre nach HTX ab, die Überlebenswahrscheinlichkeit sinkt im weiteren Verlauf jedoch deutlich schneller als bei den Patienten ohne PTLD. 15 Jahre nach HTX sind noch über 90% der Patienten ohne PTLD am Leben, während die Überlebensrate der PTLD- Patienten nur bei 70% liegt. Zu beachten ist hierbei, dass Patienten, die innerhalb der ersten drei Monate nach HTX verstarben, aus der Arbeit ausgeschlossen wurden und entsprechend nicht dargestellt sind.

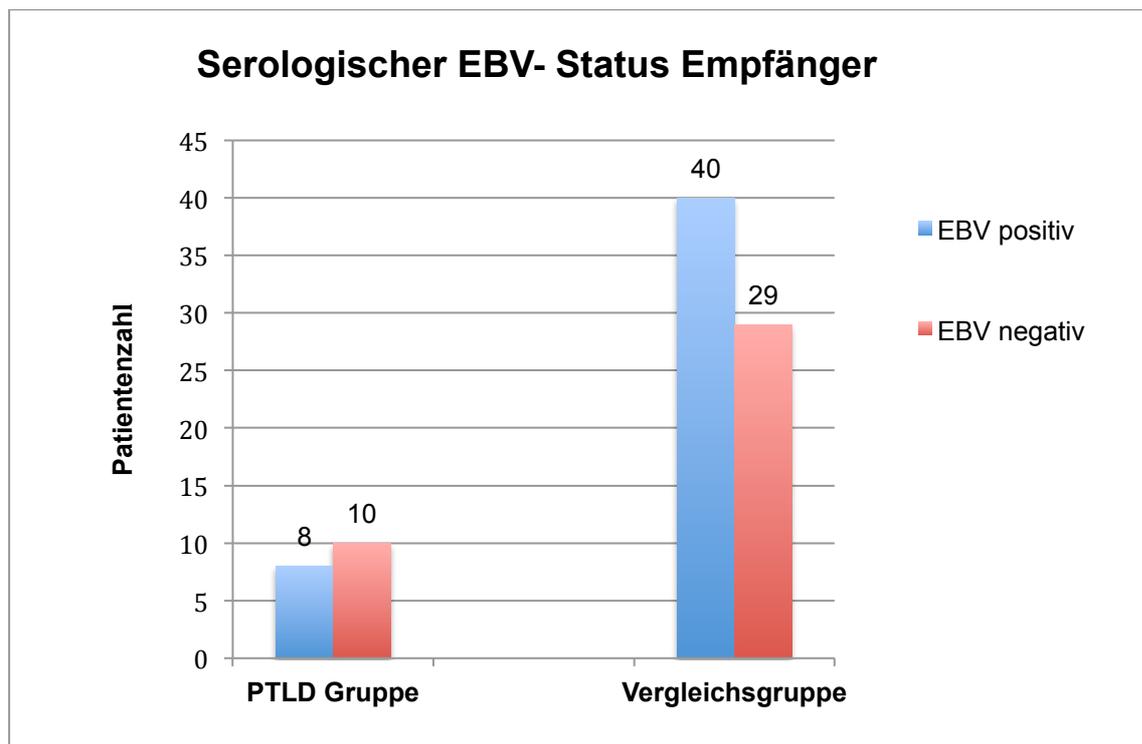
### 3.7. EBV und CMV in der PTLD- Gruppe vs. Vergleichsgruppe

#### 3.7.1. Serologischer EBV- Status der Transplantempfänger

Bei drei Patienten in der PTLD- Gruppe und bei 43 Patienten in der Vergleichsgruppe konnte retrospektiv kein serologischer EBV- Status vor Transplantation eruiert werden, so dass sich ein Anteil „nicht bekannter EBV- Status“ von 14% (3/21) in der PTLD- Gruppe und von 38% (43/112) in der Vergleichsgruppe ergab. Der Anteil EBV- seropositiver Empfänger war in beiden Gruppen ähnlich mit 38% (8/21) in der PTLD- Gruppe und 36% (40/112) in der Vergleichsgruppe. Der Anteil EBV- seronegativer Empfänger war unter den PTLD- Patienten mit 48% (10/21) höher als in der Vergleichsgruppe mit 26% (29/ 112) ( $p= 0,30$ ).

Bei den Kindern, die im Säuglingsalter transplantiert wurden, bestand zu 32% (22/ 68) eine Seropositivität vor Transplantation.

Folgende Abbildung stellt den serologischen EBV- Status der PTLD- Patienten und der Vergleichsgruppe dar (Abb. 10).



**Abbildung 10.** Serologischer EBV- Status der Transplantatempfänger in der Gruppe der Patienten mit PTLD und in der Vergleichsgruppe

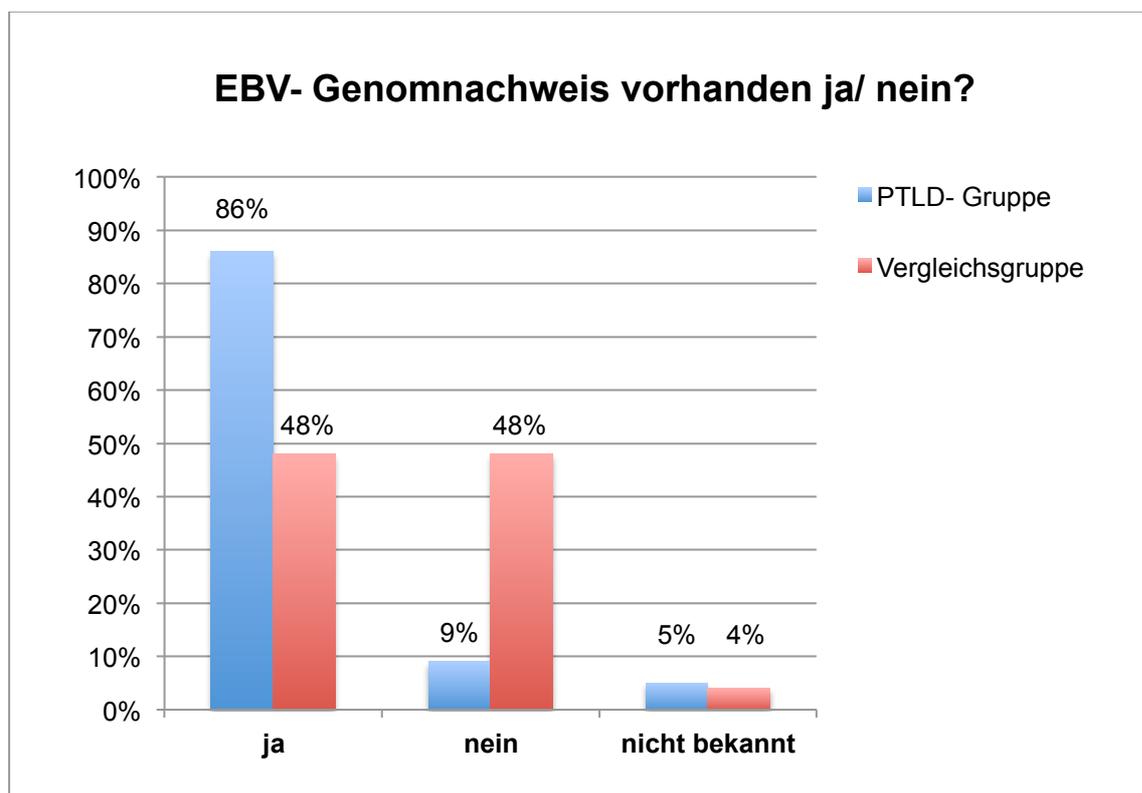
### 3.7.2. EBV- Genomnachweis im Blut

In der PTLD- Gruppe konnten statistisch signifikant häufiger EBV- Genome im Blut nachgewiesen werden als in der Vergleichsgruppe ( $p= 0,001$ ). Die Höhe der Viruslast und die Dauer einer erhöhten Viruslast wurden hierbei nicht untersucht.

In der PTLD- Gruppe lag der Anteil der Patienten mit positiven EBV- Genomnachweis bei 86% (18/21), in der Vergleichsgruppe lediglich bei 48% (54/112 Patienten).

Der Anteil der Patienten, bei denen keine durchgehenden EBV- PCR Befunde vorlagen, war in beiden Gruppen mit 5% (PTLD- Gruppe) bzw. 4% (Vergleichsgruppe) gering.

Folgende Abbildung stellt in beiden Gruppen den Anteil der Patienten dar, bei denen über den Beobachtungszeitraum EBV- Genome mittels PCR nachgewiesen werden konnten (Abb. 11).



**Abbildung 11.** Nachweis von EBV- Genomen mittels PCR in der Gruppe der PTLD- Patienten und der Vergleichsgruppe, Höhe der Viruslast nicht dargestellt

### 3.7.3. Serologischer CMV- Status

#### 3.7.3.1. CMV- Status der Spender

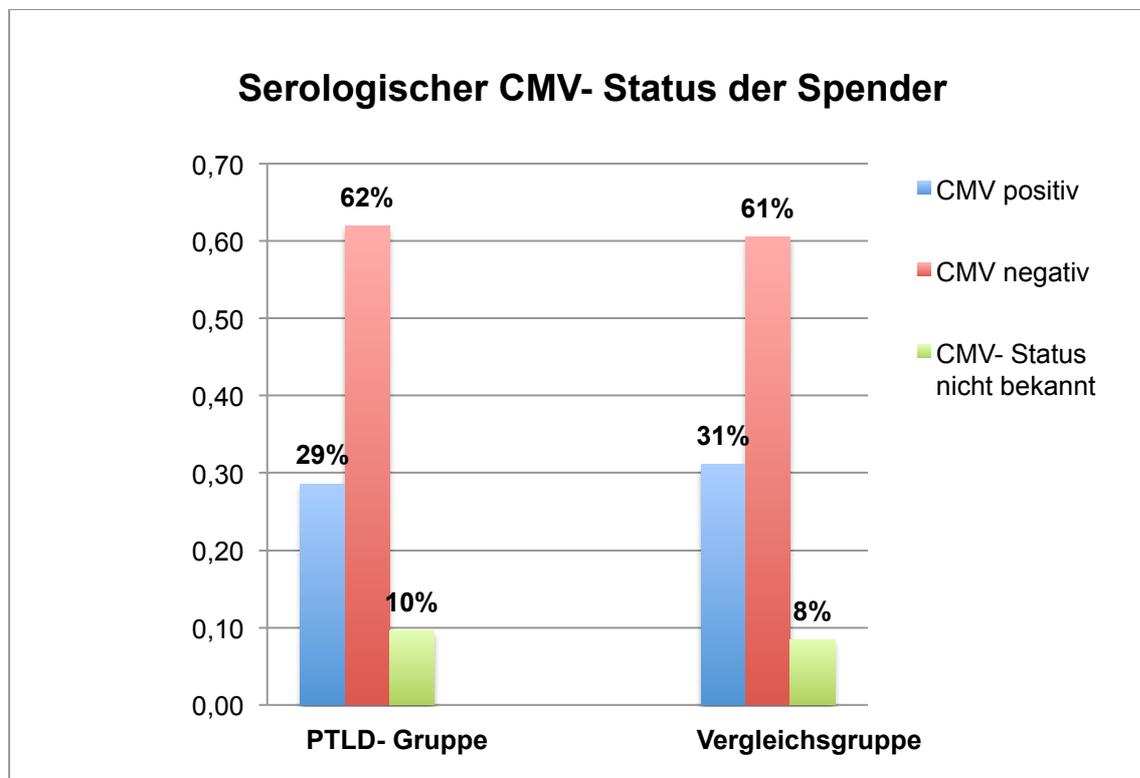
Der Spenderstatus zeigte sich in beiden Gruppen sehr ähnlich. Ca. 30% der Spenderorgane waren CMV- seropositiv, ca. 60% seronegativ und bei ca. 10% war der CMV- Status des Spenders nicht bekannt (Abb. 12).

#### 3.7.3.2. CMV- Status der Transplantempfänger

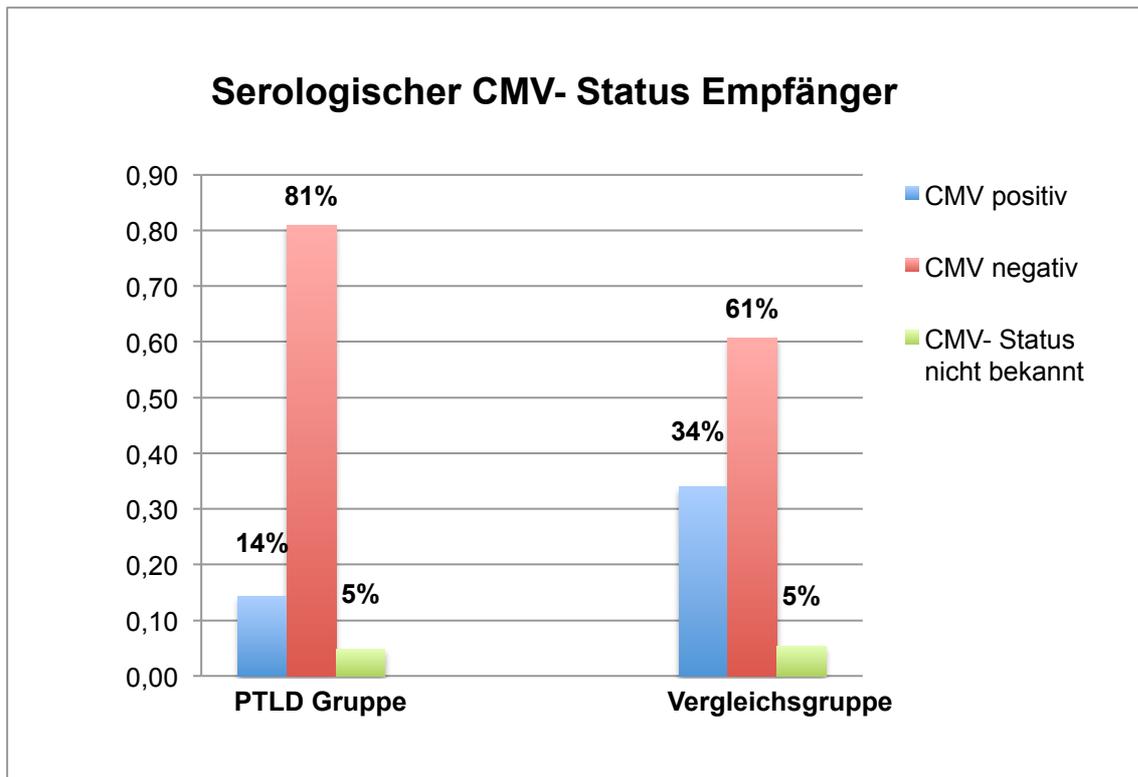
In der PTLD- Gruppe befanden sich mehr CMV- seronegative Patienten als in der Vergleichsgruppe. Bei den PTLD- Patienten lag zu 81% eine CMV- Seronegativität vor (17/21), in der Vergleichsgruppe bei 61% (68/112) der Patienten ( $p= 0,05$ ) (Abb. 13).

CMV- seropositiv waren 14% der PTLD- Patienten (3/21) und 34% (38/112) der Patienten in der Vergleichsgruppe. In beiden Gruppen war bei 5% der Patienten der CMV- Status nicht bekannt.

Die Abbildungen 12 und 13 stellen den serologischen CMV- Status bei Spender und Empfänger in beiden Gruppen dar.



**Abbildung 12.** Serologischer CMV- Status der Organspender, dargestellt für die PTLD- Patienten und die Vergleichspatienten



**Abbildung 13.** Serologischer CMV- Status der Organempfänger, dargestellt für die PTLD- Patienten und die Vergleichspatienten

#### 3.7.4. CMV- Infektion

In der PTLD- Gruppe kam es bei 14% der Patienten (3/21) zu einer (oder mehreren) CMV- Infektion(en), in der Vergleichsgruppe bei 27% (30/112) ( $p= 0,28$ ).

#### 3.8. Akute Organabstoßungen in der PTLD- Gruppe vs. Vergleichsgruppe

In der PTLD- Gruppe zeigten 67% (14/21) der Patienten mindestens eine therapiebedürftige akute Rejektion während des Beobachtungszeitraums. In der Vergleichsgruppe lag der Anteil der Patienten mit therapiebedürftigen Rejektionen insgesamt niedriger mit 59% (66/112).

Die mittlere Anzahl der therapierten Rejektionen zeigte sich in der PTLD- Gruppe nicht-signifikant höher als in der Vergleichsgruppe ( $p= 0,23$ ). Im Mittel wurden in der PTLD- Gruppe 1,15 (+/- 1,53 SD), in der Vergleichsgruppe 0,85 (+/- 0,88 SD) Abstoßungen behandelt. Der Anteil der Patienten mit zwei oder mehr behandelten Abstoßungsepisoden lag in beiden Gruppen ähnlich hoch. In der PTLD- Gruppe hatten vier von 21 Patienten (19%) zwei oder mehr Abstoßungen, in der Vergleichsgruppe 22

von 112 Patienten (20%). Die maximale Anzahl von Rejektionsepisoden lag in der PTLD- Gruppe mit sieben therapierten Ereignissen höher als in der Vergleichsgruppe mit maximal vier Rejektionen.

### 3.9. Therapie mit ATG/ OKT-3 in der PTLD- Gruppe vs. Vergleichsgruppe

In der Gruppe der PTLD- Patienten erhielten fünf von 21 Patienten (24%) eine Therapie mit ATG oder (in einem Fall) OKT-3. 13 von 21 Patienten (62%) wurden nicht mit ATG oder OKT-3 behandelt, bei drei Patienten (14%) war dies nicht bekannt. In der Vergleichsgruppe lag der Anteil der mit ATG therapierten Patienten niedriger. Nur 15% der Patienten (17 von 112) erhielten ATG, OKT-3 wurde in dieser Gruppe nicht eingesetzt (Abb. 13). Für die mit ATG behandelten Patienten ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $p= 0,50$ ).

Tabelle 6 stellt die Ergebnisse der untersuchten Risikofaktoren in der Gruppe der PTLD- Patienten und der Vergleichsgruppe ohne PTLD gegenüber.

**Tabelle 6.** Untersuchte Risikofaktoren in der Gruppe der PTLD- Patienten und der Patienten ohne PTLD (Vergleichsgruppe)

	<b>PTLD- Gruppe (n=21)</b>	<b>Vergleichsgruppe (n=112)</b>	<b>p- Wert</b>
Alter bei HTX in Jahren (Median)	0,5 (0,05- 15,6)	1,3 (0,01- 17,7)	0.17
HTX im Alter < 1 Jahr	14/21 (67%)	54/112 (48%)	0.11
EBV- Seronegativität bei HTX	10/21 (48%)	29/112 (26%)	0.30
EBV- Genomnachweis vorhanden	18/21 (86%)	54/112 (48%)	<b>0.001</b>
CMV- Seronegativität bei HTX	17/21 (81%)	68/112 (61%)	0.05
CMV- Infektion (en)	3/21 (14%)	30/112 (27%)	0.28
Anzahl von Abstoßungen (Mittelwert)	1,15 (SD 1,53)	0,85 (SD 0,88)	0.23
Anzahl mit ATG- therapierten Patienten	4/21 (19%)	17/112 (15%)	0.50

## 4. Diskussion

Mit Verbesserung der Überlebenswahrscheinlichkeit nach Herztransplantation im Kindesalter erhalten Komplikationen im Langzeitverlauf immer mehr Bedeutung. Dabei spielt die Entwicklung von transplantations-assoziierten Malignomen, insbesondere der PTLD, eine große Rolle bezüglich Morbidität und Mortalität der Langzeitüberlebenden (7, 9, 16).

Ein generelles Problem vieler Arbeiten zur PTLD nach Organtransplantation im Kindesalter stellt die verhältnismäßig kleine Fallzahl der Patienten dar. Zudem handelt es sich bei der PTLD um eine relativ neue Krankheitsentität, hinter der sehr heterogene Krankheitsbilder stehen können, was die Vergleichbarkeit der Patienten vermindert. Auch betrifft die PTLD vor allem Patienten im Langzeitverlauf nach Organtransplantation, sodass zur Untersuchung dieser Erkrankung und insbesondere zur Identifikation von Risikofaktoren lange Beobachtungszeiträume notwendig sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden 21 PTLD- Patienten bzw. 30 PTLD- Erkrankungen (inclusive rekurrierender PTLD) über einen Zeitraum von 26 Jahren retrospektiv untersucht. Insgesamt wurden Daten von 133 herztransplantierten Kindern ausgewertet, was im Bereich der Kinderherztransplantation eine verhältnismäßig große Patientengruppe eines einzelnen Zentrums darstellt.

Die Schwierigkeit dieser Arbeit lag dabei vor allem in dem langen Beobachtungszeitraum und der sich daraus ergebenden lückenhaften Datenlage in der retrospektiven Analyse. Ein Vergleich zwischen den PTLD- Patienten und der Vergleichsgruppe hinsichtlich möglicher Risikofaktoren wie Alter bei Transplantation, EBV- Serostatus des Empfängers, CMV- Status und -infektion, Anzahl von Abstoßungsepisoden, ATG-Gaben etc. mit dem Ziel der Identifizierung von Risikofaktoren in unserer Patientengruppe war daher stellenweise nur orientierend möglich. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag somit auf der Darstellung der PTLD in unserer Patientengruppe mit Untersuchung von Häufigkeiten, Lokalisation und klinischer Präsentation der Erkrankung, histopathologischen Befunden, EBV- Assoziation, Therapie und Outcome der Patienten.

### 4.1. PTLD- Inzidenz

In der vorliegenden Arbeit entwickelten 16% der in die Studie eingeschlossenen Patienten innerhalb des Beobachtungszeitraums eine PTLD.

Angaben zur Inzidenz der PTLD nach Herztransplantation im Kindesalter variieren zwischen 4%- 13% (18, 61, 64, 68, 70, 71, 119, 120). Dabei ist zu berücksichtigen,

dass einige Autoren die Inzidenz in Abhängigkeit vom Zeitabstand zur Transplantation angeben, andere eine Zeit- unabhängige Häufigkeit anführen. Bei letzterer Darstellung ist der Follow- up- Zeitraum der Patienten entscheidend, da die PTLD- Inzidenz mit dem zeitlichen Abstand zur HTX ansteigt. In dieser Arbeit war das Follow- up mit durchschnittlich 10,8 Jahren nach HTX vergleichsweise lang, so dass die verhältnismäßig hohe PTLD- Inzidenz dieser Arbeit auch als ein Effekt des langen Beobachtungszeitraums interpretiert werden kann. Auch zeigte sich ein mit 7,2 Jahren (0,5- max. 14,9 Jahren) vergleichsweise langer Abstand zwischen HTX und PTLD- Erstdiagnose. Manliot et al untersuchten in einer retrospektiven single- center Studie 173 Kinder nach Herztransplantation, von denen insgesamt 13% an einer PTLD erkrankten. Die Inzidenzen für die Zeitpunkte fünf bzw. zehn Jahre nach HTX betragen 15% bzw. 28% (61). Dagegen beschrieben Chinnock et al. in einer großen Multicenter- Studie des PHTS- Registers (Pediatric Heart Transplant Study) an 3170 untersuchten pädiatrischen HTX- Patienten eine PTLD- Inzidenz von 6% nach fünf Jahren und 10% nach zehn Jahren (64). Webber et al. führten 2006 in einer früheren Studie der PHTS eine PTLD- Inzidenz von 5% an, die Häufigkeit fünf Jahre nach HTX wurde mit 8% angegeben (18). Die PTLD- Häufigkeit in unserer Patientengruppe lag fünf Jahre nach HTX bei 6% und zehn Jahre nach HTX bei 22%, wobei sich diese Zahlen nur auf die eingeschlossenen Patienten beziehen.

Ein weiterer entscheidender Punkt, was die Wertung der PTLD- Häufigkeit in dieser Arbeit anbelangt, ist der Bezug auf die Anzahl der eingeschlossenen Patienten. Es wurden alle Patienten ausgeschlossen, die innerhalb der ersten drei Monate nach HTX verstarben. Diese Grenze wurde vor dem Hintergrund festgelegt, dass eine minimale Follow- up Zeit für die Beobachtung von Abstoßungen, CMV- Infektionen, EBV- Reaktivierungen etc. eingefordert werden sollte. Aufgrund dieser willkürlich festgelegten Grenze als Ausschlusskriterium verringerte sich die Anzahl der untersuchten Patienten. Bezogen auf alle im Kinderherzzentrum Giessen zwischen 1988 und 2014 betreuten HTX- Patienten inklusive der aus dieser Arbeit ausgeschlossenen Patienten würde sich eine Inzidenz von nur 11% ergeben. Insofern kann die erst genannte Inzidenz von 16% nur als Inzidenz unter "Langzeitüberlebenden" gewertet werden.

## 4.2. Patientenalter als Risikofaktor

In der Literatur wird das Alter des Kindes zum Zeitpunkt der Transplantation als Risikofaktor für die Entwicklung einer PTLD beschrieben, wobei jüngeres Patientenalter mit einem höheren Risiko verbunden zu sein scheint (61, 70, 74, 119, 121). Dem entspricht auch die Tatsache, dass die PTLD- Inzidenz unter erwachsenen Patienten, unabhängig vom transplantierten Organ und anderen Risikofaktoren, niedriger liegt als bei Kindern (17, 67, 85). Als Grund wird vor allem die höhere Wahrscheinlichkeit einer EBV- Seronegativität zum Zeitpunkt der Transplantation und einer damit verbundenen EBV- Primärinfektion unter Immunsuppression angenommen (17, 63, 88). Als besonders risikoreich wird dabei die Konstellation EBV- naiver Empfänger/ EBV- positiver Spender beschrieben (47, 64, 122, 123). Neben der EBV- Seronegativität des Empfängers wird auch generell das noch unreife Immunsystem von jüngeren Kindern als Ursache für das erhöhte PTLD- Risiko angeführt.

In der vorliegenden Arbeit waren die PTLD- Patienten zum Zeitpunkt der HTX tendenziell jünger als die Patienten ohne PTLD. Auch wenn kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte, zeigt sich doch eine deutliche Tendenz, die dem in der Literatur beschriebenen Zusammenhang zwischen Patientenalter und PTLD- Risiko entspricht.

Chinnock et al beschreiben interessanterweise das höchste PTLD- Risiko bei Kindern nach HTX im Alter zwischen ein bis zehn Jahren anstatt im Säuglingsalter bis zu zwölf Monaten. Als Begründung wird vermutet, dass junge Säuglinge in den ersten Lebensmonaten noch hohe EBV- Leih- Antikörpertiter besitzen, die sie vor der Entwicklung EBV- getriggelter Lymphoproliferationen nach EBV- Primärinfektion schützen. Im Vergleich dazu zeigen Kleinkinder laut der Ergebnisse dieser Studie eine erhöhte Anfälligkeit, da sie keinen mütterlichen Nestschutz durch Leih- Antikörper mehr genießen, aber oftmals vor der Transplantation noch keinen EBV- Primärkontakt hatten (64). In unserer Arbeit zeigten 32% der unter einem Jahr transplantierten Kinder eine EBV- Seropositivität. Eine Unterscheidung zwischen mütterlicher Leih- Immunität und kindlichen EBV- Antikörpern nach bereits erfolgter Primärinfektion war dabei nicht möglich. In oben genannter Studie waren dagegen 65% der Säuglinge im Alter bis zu drei Monaten EBV- seropositiv.

In der vorliegenden Arbeit wurden Kinder nach HTX im Säuglingsalter (zwischen 0-1 Jahr) bezüglich ihres PTLD- Risikos mit älteren Kindern verglichen. Der Anteil der im Säuglingsalter transplantierten Patienten lag in der PTLD- Gruppe höher als in der Vergleichsgruppe (67% vs. 48%), was von der Tendenz her wieder der generellen Beobachtung entspricht, dass junges Patientenalter bei Tx mit einem erhöhtem PTLD-

Risiko assoziiert ist. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen konnte jedoch nicht festgestellt werden. Eventuell wäre man hier zu einem eindeutigeren Ergebnis gekommen, hätte man die Altersgruppen entsprechend der beschriebenen Zusammenhänge anders gewählt und sehr junge Säuglinge unter drei bis sechs Monaten mit mütterlichem Nestschutz getrennt von älteren Säuglingen und Kleinkindern untersucht.

#### **4.3. EBV- Serostatus und Viruslast**

EBV- Seronegativität als Risikofaktor für eine PTLD konnte in dieser Arbeit nicht eindeutig gezeigt werden. Der Anteil EBV- negativer Patienten lag zwar in der PTLD- Gruppe höher als in der Vergleichsgruppe, jedoch bestand eine hohe Anzahl an Patienten, bei denen der serologische EBV- Status vor Transplantation nicht bekannt war. Dies führte zu einem statistisch nicht signifikanten Ergebnis.

Ein generelles Problem bei der Untersuchung der Risikofaktoren in unserer Patientengruppe war auch, dass alle Risikofaktoren nur getrennt voneinander betrachtet wurden. Zur Auswertung des PTLD- Risikos in Abhängigkeit von mehreren Faktoren wie z.B. EBV- Serostatus und Alter des Kindes wäre jedoch eine multivariate Analyse nötig, was aufgrund der geringen Fallzahlen nicht sinnvoll erschien.

Ein Zusammenhang zwischen der Höhe der EBV- Viruslast und dem PTLD- Risiko wird schon lange beschrieben (46, 124-126). Regelmäßige EBV- Viruslast- Messungen zur frühen Erkennung gefährdeter Patienten gelten mittlerweile als Standard in der Betreuung von Patienten nach Transplantation und sind auch seit vielen Jahren im Kinderherzzentrum Giessen etabliert. In der vorliegenden Arbeit konnten EBV- Genome statistisch signifikant häufiger in der PTLD- Gruppe als in der Vergleichsgruppe nachgewiesen werden ( $p=0,001$ ).

Die Höhe der EBV- Viruslast wurde allerdings nur bei den PTLD- Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung erhoben. Problematisch hierbei war, dass innerhalb des langen Beobachtungszeitraums die EBV- Viruslastbestimmung sowohl in verschiedenen virologischen Laboren als auch mit unterschiedlichen Methoden (Bestimmung aus Blutplasma oder aus Vollblut bzw. EDTA- Blut) durchgeführt wurde. Die Höhe der EBV- Viruslast aus Vollblut kann nicht mit der Viruslast aus Plasma/ Serum verglichen werden (127), so dass in dieser Arbeit retrospektiv nur eine Einteilung in hohe, niedrige oder negative EBV- Viruslast anhand der in der Literatur vorgeschlagenen Grenzwerte für Vollblut und Plasma/ Serum vorgenommen werden konnte. Danach zeigten Dreiviertel der PTLD- Patienten zum Zeitpunkt der Tumordiagnose eine hohe Viruslast. Die Tatsache, dass die EBV- Viruslast- Messung

im Laufe der Zeit in vier verschiedenen Laboren durchgeführt wurde, bleibt aber ein kritischer Punkt, da sich Ergebnisse verschiedener Labore unabhängig vom untersuchten Material nicht immer vergleichbar zeigen (128). Standardisierte Vorgehensweisen für EBV- DNA- Bestimmungen, wie 2011 von der WHO vorgeschlagen, sind daher wünschenswert, um in zukünftigen Arbeiten Probleme wie diese zu vermeiden (129).

#### **4.4. Weitere Risikofaktoren**

Als weitere mögliche Risikofaktoren für die Entwicklung einer PTLD werden in der Literatur CMV- Infektionen, ein negativer CMV- Serostatus vor Transplantation sowie Abstoßungsepisoden diskutiert.

In der untersuchten PTLD- Gruppe fanden sich auffallend mehr Patienten mit negativem CMV- Serostatus vor Transplantation als in der Vergleichsgruppe, eine statistische Signifikanz im Unterschied zwischen den Gruppen wurde knapp verfehlt ( $p= 0,05$ ).

CMV- Seronegativität des Empfängers wurde in einer case- control- Studie an pädiatrischen HTX- Patienten mit einem erhöhten PTLD- Risiko assoziiert (68). Auch Gao et al beschreiben in einer großen Monocenter- Studie an über 1000 HTX- und HLTX- Patienten eine signifikant erhöhte PTLD- Rate bei CMV- seronegativen Patienten (69). Dagegen zeigte sich in mehreren (Monocenter-) Studien an Patienten nach HTX im Kindesalter kein Zusammenhang zwischen CMV- Serostatus und PTLD- Risiko (61, 70, 71, 119). Opelz et al untersuchten 2009 über 18.000 Patienten nach Nierentransplantation und fanden ebenfalls keine Assoziation zwischen CMV- Serostatus und PTLD- Risiko (122).

Ebenso kontrovers diskutiert werden akute Rejektionen als Risikofaktor für die Entwicklung einer PTLD. Hier zeigen manche Studien einen Zusammenhang zwischen der Anzahl therapiebedürftiger Abstoßungen und PTLD auf (69, 119), während andere Arbeiten dies nicht bestätigen (61, 68, 70). In unserer Arbeit traten akute, therapiebedürftige Rejektionen in der PTLD- Gruppe häufiger auf als in der Vergleichsgruppe, ein signifikantes Ergebnis konnte aber nicht festgestellt werden. Anzumerken ist hierbei, dass Rejektionen in der Gruppe der PTLD- Patienten nur zeitlich vor der PTLD- Diagnose als solche gewertet wurden. Da auch die Therapie der PTLD durch die Reduktion der Immunsuppression ein Abstoßungsrisiko darstellt und somit bei Rejektionen zeitlich nach der PTLD- Diagnose nicht mehr zwischen Ursache und Wirkung unterschieden werden kann, wurde der Beobachtungszeitraum auf die Zeit bis

zur PTLD begrenzt. Dadurch unterschied sich jedoch die Follow-up Zeit der Patienten in dieser Fragestellung erheblich zwischen der PTLD- Gruppe und der Vergleichsgruppe, was die Aussagekraft des Ergebnisses vermindert.

Einzelne immunsuppressive Medikamente wurden, mit Ausnahme der T- Zell- depletierenden Medikamente ATG/ OKT-3, nicht untersucht. Die Anzahl der Patienten, die mit ATG (oder vereinzelt) OKT-3 behandelt wurden, lag in der PTLD- Gruppe zwar höher als in der Vergleichsgruppe, ein wesentlicher Unterschied ergab sich jedoch nicht. Auch konnten retrospektiv Dosierung und Therapiedauer nicht erfasst werden. Zudem wurde nicht zwischen Induktionstherapie und Rejektionsbehandlung unterschieden, was aber in der Diskussion um eine mögliche PTLD- Assoziation als wichtiger Unterschied angesehen wird. In den früheren Jahren der Herztransplantation wurden oftmals höhere Dosen zur Induktion verwendet als heutzutage üblich (130, 131), sodass die Patienten eines langen Studienzeitraums nur bedingt miteinander verglichen werden können. Frühere Arbeiten weisen eher auf ein erhöhtes Risiko unter ATG/ OKT-3 hin (67, 132-134), während aktuelle systematische Literaturreviews keine eindeutige Evidenz für ein erhöhtes PTLD- Risiko unter Induktionstherapie in heute üblicher Dosis ergeben (130, 135). Studien an Kindern nach HTX erbrachten unterschiedliche Ergebnisse: Einer großen Multicenter PHTS- Studie nach wiesen Patienten nach Induktionstherapie sogar ein niedrigeres PTLD- Risiko auf als Patienten ohne Induktionsbehandlung, wobei sich für OKT-3 noch das höchste Risiko ergab, verglichen mit ATG und den neueren Interleukin- 2 Antagonisten Daclizumab/ Basiliximab (136). In einer anderen Arbeit konnte für ATG lediglich eine Risikoerhöhung durch "extended use" (Therapiedauer über übliche drei bis sieben Tage hinaus) belegt werden (61). Gegensätzliche Ergebnisse erbrachten zwei Studien, in denen ein signifikanter Zusammenhang zwischen ATG- Gaben und PTLD- Risiko demonstriert werden konnte (70, 119).

Ebenso kontrovers gestaltet sich auch die Diskussion um Tacrolimus als möglicher Risikofaktor. In einer aktuellen deutschen Multicenter- Studie des pädiatrischen PTLD- Registers wurde Tacrolimus mit einer Risikoerhöhung für die Entwicklung einer frühen PTLD assoziiert (137). Auch andere Studien sowohl an Kindern als auch an erwachsenen Patienten zeigten ein erhöhtes PTLD- Risiko unter Immunsuppression mit Tacrolimus anstelle von CSA (63, 67, 119, 138). Andere Autoren dagegen konnten dies nicht bestätigen (61, 69).

In der vorliegenden Arbeit wurde die immunsuppressive Erhaltungstherapie im Einzelnen (CSA versus Tacrolimus, Azathioprin versus MMF) nicht untersucht. Aufgrund von Unverträglichkeiten, Komorbiditäten etc. war bei vielen Patienten über

den langen Untersuchungszeitraum eine mehrfache Änderung der immunsuppressiven Therapie notwendig. Medikamentenspiegel wurden zudem innerhalb des Beobachtungszeitraums in verschiedenen Laboren mit unterschiedlichen Methoden bestimmt, so dass eine vergleichende Analyse der immunsuppressiven Therapie retrospektiv über einen Zeitraum von 26 Jahren schwierig erschien. An dieser Stelle wäre ein kürzerer Studienzeitraum sinnvoll, in dem auch Medikamentendosierungen und Spiegelbestimmungen sowie vorübergehende individuelle Therapieänderungen berücksichtigt werden könnten.

## **4.5. Klinische Manifestation und Histologie**

### **4.5.1. Lokalisation**

Die Lokalisation der PTLD bei Kindern nach HTX wird unterschiedlich beschrieben. In unserer Arbeit war die PTLD am häufigsten im Kopf- Hals- Bereich lokalisiert, wobei das ZNS getrennt aufgeführt wurde. Eine cervikale Lymphadenopathie zeigte sich als häufigste Manifestation. Am zweithäufigsten war das Abdomen betroffen. Eine cerebrale PTLD entwickelten zwei Patienten (7%).

Nach Daten der PHTS ist nach pädiatrischer Herztransplantation am häufigsten der Gastrointestinaltrakt von einer PTLD betroffen, gefolgt von der Lunge und den Atemwegen. Eine cervikale Adenopathie als klassisches Symptom eines Lymphoms findet man als erste klinische Manifestation bei knapp 20% der Patienten (18). Das Abdomen wird auch von anderen Autoren als häufigste Lokalisation der PTLD bei Kindern nach HTX angegeben (61, 71). In der Studie von Schubert et al zeigte sich die PTLD nach pädiatrischer HTX am häufigsten in einem Befall von Lymphknoten, danach folgten Abdomen und Tonsillen/ Adenoide als Manifestationsort (70). Katz et al beschreiben zu jeweils einem Drittel Lymphadenopathie, Tonsillenhypertrophie und abdominelle Symptome als erste klinische Präsentation (68). In einer Arbeit zur PTLD nach solider Organtransplantation im Kindesalter wird, unabhängig vom transplantierten Organ, das Abdomen als häufigste Lokalisation angegeben, in absteigender Reihenfolge gefolgt von Thorax, Kopf- Hals- Bereich und ZNS (139). Eine cerebrale PTLD wird in der Literatur generell als seltenes Ereignis beschrieben (103, 106, 140-142).

#### 4.5.2. Histologische Befunde

Die Häufigkeit der histologischen Subtypen der PTLD variiert genauso wie die Lokalisation. In unserer Patientengruppe fanden sich unter den PTLD- Erstdiagnosen zu jeweils einem Drittel monomorphe diffus- großzellige B- Zell- Lymphome (DLBCL) und polymorphe PTLD. Hodgkin- like PTLD traten zu 14% auf, Burkitt- like PTLD und monomorphe T- Zell- PTLD waren mit jeweils nur zwei Fällen vertreten. Unter den Rezidiven und Zweittumoren fanden sich DLBCL am häufigsten und Hodgkin- like PTLD am zweithäufigsten.

Auch in anderen Studien an Kindern nach Herztransplantation werden DLBCL als häufigster PTLD- Typ beschrieben (68, 70). Generell werden meist DLBCL als häufigste Non- Hodgkin- Lymphome nach solider Organtransplantation genannt (74, 143, 144). Eine Studie der PHTS von 2006 kommt jedoch zu einem anderen Ergebnis, in dieser Arbeit überwiegen mit 65% eindeutig polymorphe PTLD (18). Eine Erklärung für die unterschiedliche Häufigkeitsverteilung von monomorpher versus polymorpher PTLD mag darin begründet sein, dass sehr frühe und dann oft polymorphe Formen in manchen Arbeiten nicht berichtet werden, wenn als Therapie lediglich eine Reduktion der Immunsuppression erfolgte. Early lesions werden, wie auch in der vorliegenden Arbeit, in den meisten Studien nicht erfasst, wobei die histologische Abgrenzung zwischen early lesions und polymorpher PTLD bei extranodalen Proliferationen schwierig sein kann (145).

Auffällig an den Ergebnissen unserer Arbeit ist die relative Häufigkeit der Hodgkin- like PTLD, was in den oben beschriebenen Studien seltener auftrat. Ein Grund könnte der lange Beobachtungszeitraum nach HTX darstellen, da Hodgkin- Lymphome, genauso wie auch Burkitt- like PTLD, eher als späte PTLD aufzutreten scheinen (137, 144, 146). Dies spiegelte sich in dieser Arbeit wider, der durchschnittliche Zeitabstand zwischen HTX und PTLD war bei den Patienten mit Hodgkin- like PTLD und Burkitt- like PTLD länger als bei den Patienten mit DLBCL oder polymorpher PTLD. Zwei von insgesamt fünf Hodgkin- like PTLD fanden sich in der Gruppe der Rezidive bzw. Zweittumore.

Einigkeit besteht in der hohen EBV- Assoziation der kindlichen PTLD. 78%- 90% der PTLD nach SOT im Kindesalter werden als EBV- positiv beschrieben (18, 61, 70, 74). In der vorliegenden Arbeit konnte in 75% der Fälle EBV mittels EBER-1 in- Situ Hybridisierung nachgewiesen werden, 14% der Tumore waren EBV negativ, was somit gut mit den Ergebnissen anderer Studien vergleichbar ist.

Dabei findet sich auch ein zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Abstand der PTLD zur Transplantation und der EBV- Assoziation. Schober et al beispielsweise unter-

suchten 127 pädiatrische Patienten des deutschen Ped- PTLD- Registers und zeigten, dass eine frühe PTLD, definiert meist als "early PTLD" innerhalb des ersten Jahres nach Tx, signifikant häufiger mit EBV assoziiert ist als eine spät auftretende PTLD (137). Dies wurde bereits zuvor von etlichen anderen Autoren beschrieben (67, 77, 78, 147). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte dieser Zusammenhang bestätigt werden, EBV- positive PTLD traten bei unseren Patienten signifikant früher auf als EBV- negative PTLD ( $p=0,008$ ). Kritisch anzumerken ist hierbei jedoch, dass die Gruppe der EBV- negativen PTLD lediglich aus vier Patienten bestand.

#### **4.6. Therapie**

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht die Unterschiedlichkeit der angewandten Therapiekonzepte, die sich nach histologischem Subtyp der PTLD, Lokalisation und Tumorstadium richten. Die Non- Hodgkin- PTLD wurden größtenteils mit einer Rituximab- Monotherapie behandelt (44%), fünf Patienten erhielten eine Kombinationstherapie aus Rituximab und low- dose Chemotherapie und ein Patient eine Polychemotherapie nach Burkitt- Lymphom Protokoll ohne Rituximab. Vier Patienten wurden individualisiert behandelt und bei drei Patienten erfolgte nur eine Reduktion der Immunsuppression.

Einen vergleichsweise großen Anteil machten in dieser Arbeit Patienten mit Hodgkin- Lymphom- like PTLD aus, die entsprechend der Protokolle eine klassische Hodgkin- Lymphom Therapie erhielten.

Die Patienten mit cerebraler PTLD oder disseminiertem Befall mussten individuell mit aggressiverer Chemotherapie und/oder intrathekalen Gaben behandelt werden. Auch in der Literatur wird für disseminierte PTLD mit Befall des ZNS oder des Knochenmarks aufgrund der schlechten Prognose ein deutlich aggressiveres multimodales therapeutisches Vorgehen empfohlen (103, 106).

Ein Patient erhielt eine Therapie mit EBV- spezifischen zytotoxischen T- Lymphozyten (CTL), was aktuell als vielversprechende, jedoch noch sehr aufwendige und nicht immer praktikable Methode angesehen wird (74, 107, 108). Zur Verbesserung der Verfügbarkeit von EBV- spezifischen CTLs wurden in den letzten Jahren spezielle CTL- Banken eingerichtet (148, 149). Das Outcome unseres Patienten nach EBV- spezifischer CTL kann derzeit noch nicht abschließend beurteilt werden, da diese Therapie erst im letzten Jahr des Untersuchungszeitraums durchgeführt wurde.

## 4.7. Outcome

### 4.7.1. Remissionsraten und Überleben der PTLD- Patienten

Eine komplette Remission wurde initial in unserer Patientengruppe bei 81% der behandelten Patienten erreicht. Knapp 40% der Patienten erlangten eine anhaltende komplette Remission, 38% erkrankten an einem Rezidiv oder einem Zweittumor. Von den acht Patienten mit Rezidiv bzw. Zweittumor überlebten sechs Patienten und zeigten bis zum Ende des Studienzeitraums eine anhaltende komplette Remission nach Therapie der zweiten PTLD. Somit konnte letztlich bei Zweidrittel aller Patienten eine anhaltende komplette Remission erreicht werden.

Vergleichbare Daten zum Outcome von pädiatrischen PTLD- Patienten nach HTX liegen nur vereinzelt vor. Webber et al berichten 2005 über ähnliche Ansprechraten bei Patienten der PHTS, eine komplette initiale Remission wurde bei 75% der Patienten erreicht, eine anhaltende komplette Remission bei 61% der Patienten. Allerdings wurden in dieser Studie nur wenige Patienten mit Rituximab behandelt, da sich Rituximab zu dem Zeitpunkt (Studienzeitraum bis 2002) noch nicht als Standardtherapie der PTLD etabliert hatte. Das ereignisfreie Überleben („freedom from death or recurrence“) zu definierten Zeitpunkten wird in oben genannter Arbeit mit 73% nach einem Jahr, 61% nach drei Jahren und 56% nach fünf Jahren angegeben (18). Auch Manliot et al berichten über ähnliche Ergebnisse in ihrer Patientengruppe (61).

Eine rekurrende PTLD bestand in unserer Patientengruppe zu 38%, wobei es sich in den meisten Fällen nicht um Rezidive, sonst um Zweittumore handelte. Bei knapp 90% der Patienten mit rekurrender PTLD lag zunächst eine komplette Remission vor, so dass die durchgeführte Therapie als erfolgreich zu werten ist. Ein Grund für das relativ häufige Auftreten von z.T. späten Rezidiven oder Zweittumore ist sicherlich der lange Untersuchungszeitraum der Studie, da auch Zweittumore mit einem maximalen Abstand zur ersten PTLD von elf Jahren erfasst werden konnten.

In einem aktuellen Review wurden Überlebensraten für pädiatrische Patienten nach solider Organtransplantation (SOT) getrennt für den Zeitraum vor und nach Einführung von Rituximab ausgewertet (74). Es wurden 2- Jahresüberlebensraten von 70-75% in der Zeit vor Einführung von Rituximab und von 80-85% nach Etablierung von Rituximab in der PTLD- Therapie beschrieben (18, 98, 137, 150). In einer internationalen, prospektiven Studie an erwachsenen PTLD- Patienten unter sequentieller Therapie mit Rituximab und CHOP- Chemotherapie wurden zuletzt Überlebensraten von 61% nach drei Jahren und 55% nach fünf Jahren erreicht (97).

Das Ansprechen auf einzelne Therapiemodalitäten, beispielsweise auf eine Rituximab-Monotherapie im Vergleich zu einer Kombinationstherapie aus Rituximab und Chemotherapie, wurde in dieser Arbeit aufgrund der geringen Fallzahlen nicht untersucht. Etliche der zwischen 2005 und 2012 erkrankten Patienten konnten jedoch in die deutsche Ped-PTLD Pilotstudie eingeschlossen werden, die als große prospektive Therapiestudie Rituximab und Chemotherapie bei Kindern nach SOT vergleicht. Die Ergebnisse dieser Studie wurden bisher noch nicht veröffentlicht.

#### **4.7.2. Langzeitüberleben der PTLD- Patienten/ Vergleichspatienten**

Im Langzeitverlauf zeigte sich in den Überlebenskurven ein deutlicher Überlebensvorteil der Patienten ohne PTLD. Hierbei muss wieder berücksichtigt werden, dass es sich, speziell bei den Todesfällen innerhalb der PTLD- Gruppe, um geringe Fallzahlen handelt und einzelne Patienten somit sehr ins Gewicht fielen. Unter den sechs verstorbenen Patienten in der PTLD- Gruppe befanden sich zwei Patienten, bei denen keine bzw. nur eine eingeschränkte onkologische Therapie auf Wunsch der Patienten aufgrund schwerer Komorbiditäten/ Vorerkrankungen erfolgte.

In einer kürzlich publizierten internationalen Studie auf der Datengrundlage eines multi-institutionalen Transplant- Registers wurde der Zusammenhang zwischen PTLD-Erkrankungen und reduziertem Langzeitüberleben zuletzt bestätigt (120).

Die Patienten der Vergleichsgruppe ohne PTLD zeigten ein sehr gutes Langzeitüberleben. Nicht eingeschlossen waren in die vorliegende Überlebenszeitanalyse die Patienten, die bereits in den ersten drei Monaten nach HTX verstarben. Insofern können diese Ergebnisse nur als Überleben im Langzeitverlauf interpretiert werden und nicht als generelle Überlebensrate nach HTX in unserer Patientengruppe. 11,7% der Patienten verstarben innerhalb der ersten drei Monate nach Transplantation, wobei diese überwiegend in den Anfangsjahren der Kinderherztransplantation behandelt wurden.

Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Bedeutung der PTLD als schwere, potentiell lebensbedrohliche Komplikation im Langzeitverlauf nach HTX im Kindesalter. Die Heterogenität der Erkrankung, die Variabilität der Lokalisation, der klinischen Beschwerdesymptomatik, Histologie etc. erschweren die Diagnostik und Therapie der Erkrankung. Neben der Optimierung der PTLD- Therapie durch nationale und internationale prospektive Therapiestudien stehen daher auch präventive Maßnahmen im Fokus der PTLD- Forschung. Aufgrund der

hohen EBV- Assoziation der kindlichen PTLD, die auch in dieser Arbeit bestätigt werden konnte, werden aktuell Studien durchgeführt, die z.B. auf eine präventive Therapie mit Rituximab bei anhaltend hoher EBV- Viruslast zielen (151, 152).

#### **4.8. Limitationen und Ausblick**

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine größtenteils deskriptive, monozentrische Erhebungsstudie an herztransplantierten Kindern. Die Daten wurden ausschließlich retrospektiv erfasst, so dass sich vereinzelt fehlende Daten nicht vermeiden ließen, insbesondere, da der untersuchte Zeitraum mit 26 Jahren sehr lang war. Bei einer ohnehin niedrigen Zahl an erkrankten Patienten (n= 21) fiel dies in der Auswertung stellenweise deutlich ins Gewicht. Verglichen mit anderen monozentrischen Studien an PTLD- Patienten nach Herztransplantation im Kindesalter lag die Anzahl der untersuchten PTLD- Patienten in unserer Arbeit jedoch eher im höheren Bereich (61, 68, 70, 71).

Zur orientierenden Analyse von Risikofaktoren in unserer Patientengruppe wurden die PTLD- Patienten mit Patienten ohne PTLD verglichen. Bei der statistischen Überprüfung der Signifikanz eines auffälligen Unterschiedes zwischen den Gruppen wurde die Aussagekraft des Ergebnisses teilweise durch niedrige Patientenzahlen eingeschränkt. Auch wurden mögliche Risikofaktoren wie Rejektionen, CMV- Infektionen etc. in der PTLD- Gruppe nur bis zum Zeitpunkt der Diagnose erfasst, zeitlich danach auftretende Ereignisse wurden nicht gewertet. Das bedeutete aber eine Inkaufnahme von durchschnittlich kürzeren Beobachtungszeiten in der PTLD- Gruppe als in der Vergleichsgruppe, was die Vergleichbarkeit minderte.

EBV- Serologien waren von den Transplantatempfängern nur unvollständig vorliegend, von den Organ Spendern waren sie im Allgemeinen nicht bekannt. Ein Zusammenhang zwischen EBV und der Entwicklung einer PTLD konnte über den EBV- Nachweis im Tumor mittels EBER- in situ- Hybridisierung sowie über die EBV- Viruslast der PTLD- Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung aufgezeigt werden. Hier war jedoch die Vergleichbarkeit der Viruslastmessungen durch die Bearbeitung in verschiedenen virologischen Laboren eingeschränkt. Aus diesem Grund musste auf eine durchgehende Verlaufsuntersuchung der EBV- Kopienzahl verzichtet werden, weswegen weder signifikante Anstiege in der Viruslast noch chronisch hohe Viruslasten retrospektiv bestimmt werden konnten. Dies spielt aber eine bedeutsame klinische Rolle, wenn transplantierte Patienten mit erhöhtem PTLD- Risiko frühzeitig erkannt und

(nach Möglichkeit präventiv) behandelt werden sollen. In der klinischen Betreuung der HTX- Patienten am Kinderherzzentrum ist die regelmäßige und bei Bedarf kurzfristige Kontrolle der EBV- Viruslast aus diesem Grund bereits seit vielen Jahren etabliert. Eine detaillierte retrospektive Auswertung der EBV- Befunde wäre möglich, wenn man den Untersuchungszeitraum auf einige ausgewählte Jahre beschränken würde, in denen die Viruslastmessungen durchgehend in einem Labor mit gleicher Methodik durchgeführt wurden.

Weiterer Kritikpunkt der Arbeit ist die fehlende Auswertung der immunsuppressiven Erhaltungstherapie. Auch an dieser Stelle wäre eine Beschränkung des Untersuchungszeitraums nötig gewesen, um auch kurzfristige Therapieänderungen, Medikamentenspiegel etc. berücksichtigen zu können. Schwerpunkt dieser Arbeit war jedoch die möglichst umfassende Beschreibung der PTLD- Erkrankung in unserer Patientengruppe, was den längst möglichen Beobachtungszeitraum erforderte.

Die Untersuchung der einzelnen immunsuppressiven Medikamente hinsichtlich des PTLD- Risikos wäre in Hinblick auf eine eventuelle Verbesserung des bestehenden immunsuppressiven Regimes im Sinne einer PTLD- Prävention sinnvoll, vor allem auch in Anbetracht von fehlenden einheitlichen Empfehlungen oder Leitlinien für die Immunsuppression von Kindern nach Herztransplantation. Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung und der damit verbundenen niedrigen Patientenzahlen sollte dies bestenfalls in prospektiven Studien in Zusammenarbeit mit anderen Zentren durchgeführt werden. Generell wäre die Erstellung einer zentrumsübergreifenden pädiatrischen HTX- Datenbank bzw. eines Registers wünschenswert, um Erkrankungen im Langzeitverlauf besser untersuchen zu können und die Diagnostik und Behandlung von Komplikationen wie der PTLD zu optimieren.

## 5. Zusammenfassung (deutsch/ englisch)

### Zusammenfassung

**Hintergrund:** Durch Verbesserung der Überlebenschancen nach Herztransplantation (HTX) im Kindesalter bekommen Langzeitkomplikationen eine zunehmende Bedeutung. Die posttransplantationslymphoproliferative Erkrankung (PTLD) als potentiell lebensbedrohliche Erkrankung entsteht auf dem Boden der lebenslangen Immunsuppression und ist bei Kindern in den meisten Fällen mit dem Epstein- Barr- Virus (EBV) assoziiert. Als weitere Risikofaktoren für die Entwicklung einer PTLD werden junges Patientenalter bei Transplantation, Infektionen mit dem Cytomegalievirus (CMV), Abstoßungen und verschiedene immunsuppressive Medikamente diskutiert. Das Ziel dieser Arbeit war, die Häufigkeit, Lokalisation, Pathologie, EBV- Assoziation, Therapie der PTLD sowie das Outcome der Patienten zu definieren und orientierend Risikofaktoren für die Entwicklung einer PTLD in unserer Patientengruppe zu identifizieren.

**Methodik:** Am Giessener Kinderherzzentrum wurden 133 Patienten nach HTX im Kindesalter, die nach HTX mindestens drei Monate überlebten, retrospektiv über einen Zeitraum von 26 Jahren (1988-2014) untersucht. Die Charakteristika der PTLD-Patienten wurden mit denen der Patienten ohne PTLD verglichen. Ausschlusskriterien waren Alter bei HTX über 18 Jahre, keine durchgehende Betreuung im Kinderherzzentrum, Tod innerhalb der ersten drei Monate nach HTX oder ein Follow-up von weniger als drei Monaten.

**Ergebnisse:** 16% der eingeschlossenen Patienten (21/133) entwickelten im Median nach 7,2 Jahren (0,5- 14,9 Jahren) im Alter von 8,3 Jahren (1,6- 25,8 Jahren) eine PTLD. PTLD- Patienten waren zum Zeitpunkt der HTX tendenziell (nicht signifikant) jünger als die Vergleichspatienten und zeigten häufiger eine EBV- und CMV-Seronegativität. Die mittlere Anzahl therapeutischer Abstoßungen und der Anteil der mit Antithymozytenglobulin (ATG) behandelten Patienten waren in der Gruppe der PTLD-Patienten nicht signifikant höher als in der Vergleichsgruppe.

Als häufigste Lokalisation der PTLD stellte sich der Kopf- Hals- Bereich (ohne ZNS) dar, gefolgt vom Abdomen. Histologisch fanden sich zu jeweils einem Drittel (7/21) ein monomorphes diffus- großzelliges B- Zell- Lymphom (DLBCL) und eine polymorphe PTLD. Drei Patienten wiesen ein Hodgkin- Lymphom bzw. eine Hodgkin- like PTLD auf und jeweils zwei Patienten eine monomorphe B- Zell- PTLD vom Burkitt- Typ sowie eine monomorphe T- Zell- PTLD. EBV konnte bei 75% der Tumore mittels EBER- 1- in situ- Hybridisierung nachgewiesen werden, wobei ein EBV- Nachweis signifikant mit

früherem Auftreten der PTLD nach HTX korrelierte. PTLD- Patienten hatten signifikant häufiger einen positiven EBV- Genom- Nachweis im Blut als Kontrollpatienten. Zum Zeitpunkt der PTLD- Diagnose lag bei 77% der Patienten eine hohe EBV- Viruslast vor. 38% der PTLD- Patienten entwickelten eine rekurrende PTLD, bei der es sich in fünf von acht Fällen nicht um Rezidive, sondern um Zweittumore handelte. In der Gruppe der Rezidive und Zweittumore stellten DLBCL den häufigsten histologischen Subtyp dar (4/8), gefolgt von der Hodgkin- like PTLD (2/8). Neben der Reduktion der Immunsuppression umfasste die Therapie je nach PTLD- Subtyp, Lokalisation, Stadium und Ansprechen Rituximab, Chemotherapie, eine chirurgische Resektion, Bestrahlung und/ oder eine Immuntherapie mit EBV- spezifischen cytotoxischen T- Zellen (CTL). In der PTLD- Gruppe überlebten bis zum Ende des Studienzeitraums 71% der Patienten (15/21), in der Gruppe der Patienten ohne PTLD 93% (104/12).

**Schlussfolgerung:** Bei der PTLD handelt es sich um eine histologisch heterogene Erkrankung. Das Langzeitüberleben nach PTLD ist trotz guter Therapieerfolge erheblich beeinträchtigt. Der zukünftige Fokus sollte neben der Entwicklung neuer Therapieoptionen auf der Prävention der Erkrankung und der genauen Definition von Risikofaktoren liegen.

## **Abstract**

**Background:** Because of the increasing long- term survival after pediatric heart transplantation, long- term complications due to the lifetime immunosuppression become more relevant. Posttransplant lymphoproliferative disease (PTLD) is a potentially life- threatening event, which can mostly be associated with the Epstein-Barr virus (EBV), particularly in the childhood. Further clinical risk factors, such as a young age at the time of transplantation, infections with CMV, rejections and the type of immunosuppression are discussed in literature. The aim of the study was to define the incidence, clinical manifestation, histology, association to EBV, treatment and outcome and to evaluate potential risk factors for the development of PTLD in our patients.

**Methods:** At the Pediatric Heart Center Giessen 21 patients suffering from PTLD were retrospectively reviewed over a study- period of 26 years (1988-2014) and compared to 112 healthy heart- transplanted children. Criteria for exclusion were ages over 18 years at time of transplantation, death after HTX within three months, no regular follow- up or minimal follow- up less than three months.

**Results:** PTLD was diagnosed in 16% (21/133) of the included patients at a median age of 8.3 years (1.6- 25.8 y/o) after a median post- transplant period of 7.2 years (0.5- 14.9 y/o). Concerning the PTLD- patients, there was a trend (not significant) to younger age at transplantation and to a higher frequency of seronegativity of EBV and CMV compared to the patients without PTLD. Mean rejection episodes and treatment with ATG were insignificantly higher in the PTLD- patient group.

Most common sites of PTLD were head and neck (without CNS), followed by the abdomen. Histology was most frequently monomorphic DLBCL (7/21) and polymorphic PTLD (7/21). Three patients showed a Hodgkin- like PTLD, two patients a monomorphic Burkitt- lymphoma and two more patients a monomorphic T- cell- PTLD. 75% of the tumours were EBV- positive by EBER-1 in- situ hybridization, which was significantly correlated with earlier occurrence of PTLD. Within the PTLD- patient group, there was a significant higher frequency of elevated EBV- viral load in the blood than in the comparison group. At the time of the first diagnosis 77% of the PTLD- patients showed a high viral load.

Recurrent PTLD occurred in 38% of the cases, but more often (5/8) as second malignancy than as relapse. Within the recurrent PTLD, DLBCL was diagnosed most frequently in four cases, followed by Hodgkin- like PTLD in two cases.

Besides reduction of immunosuppression, which was performed in all patients, therapy consisted of rituximab, chemotherapy, surgery, radiation and/or EBV- specific cytotoxic

T- cell therapy (CTL). Survival over the study period was 71% (15/21) in the PTLD-patient group and 93% (104/112) in the comparison group without PTLD.

**Conclusion:** PTLD is a histologically heterogeneous disease. The long- term survival after pediatric heart transplantation can be seriously impaired by PTLD, despite the appropriate therapy. Besides the development of new treatment options, further efforts are needed to define risk factors exactly and to prevent PTLD.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

ALG	Antilymphozytenglobulin
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ATG	Antithymozytenglobulin
CCR	Anhaltende komplette Remission
CD	Cluster of Differentiation
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon
CMV	Cytomegalievirus
CR	Komplette Remission
CSA	Ciclosporin A
CTL	Cytotoxische (EBV- spezifische) T- Lymphozyten
DCM	Dilatative Cardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DLBCL	Diffus- großzelliges B- Zell Lymphom
EBER	Epstein- Barr encoded RNA
EBNA	Epstein- Barr Nuclear Antigen
EBV	Epstein- Barr- Virus
EMAH	Erwachsene mit angeborenen Herzfehlern
gp	Glykoprotein
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
HL	Hodgkin Lymphom
HTX	Herztransplantation
ISHLT	„International Society for Heart and Lung Transplantation“
miRNA	mitochondriale Ribonukleinsäure
MMF	Mycophenolat mofetil
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NHL	Non- Hodgkin Lymphom
OKT-3	monoklonaler Anti- CD3- Antikörper Muromonomab
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHTS	„Pediatric Heart Transplant Study“
PTLD	Posttransplantationslymphoproliferative Erkrankung
RNA	Ribonukleinsäure
SOT	Solide Organtransplantation

Tx	Transplantation
VCA	Virales Kapsid Antigen
Vs.	versus
WHO	„ World Health Organisation“
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 7. Tabellen-/ Abbildungsverzeichnis

<b>Tabelle 1.</b> Histologische Klassifikation der PTLD. Entwicklung durch die WHO 2008 (72), modifiziert nach (62) .....	14
<b>Tabelle 2.</b> St. Jude- Klassifikation für NHL im Kindesalter, modifiziert nach (81, 83)...	16
<b>Tabelle 3.</b> Stadieneinteilung der Hodgkin Lymphome nach Ann- Arbor- Klassifikation (82), modifiziert nach (84) .....	17
<b>Tabelle 4.</b> Einteilung der EBV- Viruslast in hohe und niedrige Viruslast, getrennt dargestellt für Vollblut (bzw. EDTA- Blut) und Plasma (bzw. Serum) .....	26
<b>Tabelle 5.</b> Vergleich der histologischen Subtypen der PTLD- Rezidive bzw. Zweitumore mit dem histologischen Subtyp der jeweils ersten PTLD.....	35
<b>Tabelle 6.</b> Untersuchte Risikofaktoren in der Gruppe der PTLD- Patienten und der Patienten ohne PTLD (Vergleichsgruppe).....	49
<b>Abbildung 1.</b> Prozentualer Anteil der Patienten nach HTX im Säuglingsalter (< 1 Jahr) in der PTLD- Gruppe und der Vergleichsgruppe.....	32
<b>Abbildung 2.</b> Lokalisation der PTLD: Darstellung der beteiligten Organsysteme, Mehrfachzählungen der PTLD bei multi-lokalem Befall .....	33
<b>Abbildung 3.</b> Prozentuale Verteilung der histologischen Subtypen der PTLD (klassifiziert nach WHO 2008), Darstellung der Ersttumore unter Ausschluss der Rezidive und Zweittumore.....	36
<b>Abbildung 4.</b> Verteilung der histologischen PTLD- Subtypen der Rezidive und Zweittumore (klassifiziert nach WHO 2008), Darstellung der absoluten Anzahlen (n= 9) .....	37
<b>Abbildung 5.</b> Prozentuale Verteilung der EBV- Viruslast der Patienten zum Zeitpunkt der PTLD- Diagnose: Einteilung der Viruslast in hoch, niedrig, negativ, nicht bekannt	38
<b>Abbildung 6.</b> Stadieneinteilung nach St. Jude. Darstellung der PTLD- Patienten mit Ausnahme der Patienten mit Hodgkin- Lymphom PTLD bzw. Hodgkin- like PTLD.....	39
<b>Abbildung 7.</b> Stadieneinteilung nach Ann Arbor. Darstellung der Patienten mit Hodgkin- Lymphom PTLD bzw. Hodgkin- like PTLD. ....	40
<b>Abbildung 8.</b> Überlebenszeitkurve: wahrscheinliche Überlebenszeit in Jahren, dargestellt für alle in die Arbeit eingeschlossenen Patienten zusammen (mit und ohne PTLD).....	43
<b>Abbildung 9.</b> Überlebenszeitkurve: wahrscheinliche Überlebenszeit in Jahren, getrennt dargestellt für die Gruppe der PTLD- Patienten und die Vergleichsgruppe....	44

**Abbildung 10.** Serologischer EBV- Status der Transplantatempfänger in der Gruppe der Patienten mit PTLD und in der Vergleichsgruppe .....45

**Abbildung 11.** Nachweis von EBV- Genomen mittels PCR in der Gruppe der PTLD- Patienten und der Vergleichsgruppe, Höhe der Viruslast nicht dargestellt .....46

**Abbildung 12.** Serologischer CMV- Status der Organspender, dargestellt für die PTLD- Patienten und die Vergleichspatienten .....47

**Abbildung 13.** Serologischer CMV- Status der Organempfänger, dargestellt für die PTLD- Patienten und die Vergleichspatienten .....48

## 8. Literaturverzeichnis

1. Carrel A & Guthrie C (1905) The transplantation of veins and organs. *American Medicine* 10:1101-1102.
2. Lower RR & Shumway NE (1960) Studies on orthotopic homotransplantation of the canine heart. *Surgical forum* 11:18-19.
3. Barnard CN (1968) Human cardiac transplantation. An evaluation of the first two operations performed at the Groote Schuur Hospital, Cape Town. *The American journal of cardiology* 22(4):584-596.
4. Kantrowitz A, Haller JD, Joos H, Cerruti MM, & Carstensen HE (1968) Transplantation of the heart in an infant and an adult. *The American journal of cardiology* 22(6):782-790.
5. Lund LH, et al. (2013) The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirtieth Official Adult Heart Transplant Report--2013; focus theme: age. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 32(10):951-964.
6. Bailey LL, et al. (1986) Cardiac allotransplantation in newborns as therapy for hypoplastic left heart syndrome. *The New England journal of medicine* 315(15):949-951.
7. Dipchand AI, et al. (2014) The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: seventeenth official pediatric heart transplantation report--2014; focus theme: retransplantation. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 33(10):985-995.
8. Dipchand AI, et al. (2013) Ten yr of pediatric heart transplantation: a report from the Pediatric Heart Transplant Study. *Pediatric transplantation* 17(2):99-111.
9. Thrush PT & Hoffman TM (2014) Pediatric heart transplantation-indications and outcomes in the current era. *Journal of thoracic disease* 6(8):1080-1096.
10. Canter CE, et al. (2007) Indications for heart transplantation in pediatric heart disease: a scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young; the Councils on Clinical Cardiology, Cardiovascular Nursing, and Cardiovascular Surgery and Anesthesia; and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. *Circulation* 115(5):658-676.

11. Voeller RK, et al. (2012) Trends in the indications and survival in pediatric heart transplants: a 24-year single-center experience in 307 patients. *The Annals of thoracic surgery* 94(3):807-815; discussion 815-806.
12. Jefferies JL & Towbin JA (2010) Dilated cardiomyopathy. *Lancet* 375(9716):752-762.
13. Towbin JA, et al. (2006) Incidence, causes, and outcomes of dilated cardiomyopathy in children. *Jama* 296(15):1867-1876.
14. Lipshultz SE, et al. (2013) Pediatric cardiomyopathies: causes, epidemiology, clinical course, preventive strategies and therapies. *Future cardiology* 9(6):817-848.
15. Mahle WT (2008) Cardiac retransplantation in children. *Pediatric transplantation* 12(3):274-280.
16. LaRosa C, Baluarte HJ, & Meyers KE (2011) Outcomes in pediatric solid-organ transplantation. *Pediatric transplantation* 15(2):128-141.
17. Green M & Michaels MG (2013) Epstein-Barr virus infection and posttransplant lymphoproliferative disorder. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 13 Suppl 3:41-54; quiz 54.
18. Webber SA, et al. (2006) Lymphoproliferative disorders after paediatric heart transplantation: a multi-institutional study. *Lancet* 367(9506):233-239.
19. Buell JF, et al. (2006) Malignancy in pediatric transplant recipients. *Seminars in pediatric surgery* 15(3):179-187.
20. Penn I (1993) Incidence and treatment of neoplasia after transplantation. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 12(6 Pt 2):S328-336.
21. Penn I (1994) De novo malignancy in pediatric organ transplant recipients. *Journal of pediatric surgery* 29(2):221-226; discussion 227-228.
22. Doak PB, Montgomerie JZ, North JD, & Smith F (1968) Reticulum cell sarcoma after renal homotransplantation and azathioprine and prednisone therapy. *Br Med J* 4(5633):746-748.
23. Penn I, Hammond W, Brettschneider L, & Starzl TE (1969) Malignant lymphomas in transplantation patients. *Transplantation proceedings* 1(1):106-112.
24. Geis WP, et al. (1978) Pseudolymphoma in renal allograft recipients. *Archives of surgery* 113(4):461-466.
25. Starzl TE, et al. (1984) Reversibility of lymphomas and lymphoproliferative lesions developing under cyclosporin-steroid therapy. *Lancet* 1(8377):583-587.

26. Hanto DW, et al. (1981) The Epstein-Barr virus (EBV) in the pathogenesis of posttransplant lymphoma. *Transplantation proceedings* 13(1 Pt 2):756-760.
27. Ho M, et al. (1985) Epstein-Barr virus infections and DNA hybridization studies in posttransplantation lymphoma and lymphoproliferative lesions: the role of primary infection. *The Journal of infectious diseases* 152(5):876-886.
28. Thorley-Lawson DA & Gross A (2004) Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *The New England journal of medicine* 350(13):1328-1337.
29. Morscio J, Dierickx D, & Tousseyn T (2013) Molecular pathogenesis of B-cell posttransplant lymphoproliferative disorder: what do we know so far? *Clinical & developmental immunology* 2013:150835.
30. Cohen JI (2000) Epstein-Barr virus infection. *The New England journal of medicine* 343(7):481-492.
31. Epstein MA & Barr YM (1964) Cultivation in Vitro of Human Lymphoblasts from Burkitt's Malignant Lymphoma. *Lancet* 1(7327):252-253.
32. Diehl V, Henle G, Henle W, & Kohn G (1968) Demonstration of a herpes group virus in cultures of peripheral leukocytes from patients with infectious mononucleosis. *Journal of virology* 2(7):663-669.
33. Coghill AE & Hildesheim A (2014) Epstein-Barr virus antibodies and the risk of associated malignancies: review of the literature. *American journal of epidemiology* 180(7):687-695.
34. Ginsburg CM, Henle W, Henle G, & Horwitz CA (1977) Infectious mononucleosis in children. Evaluation of Epstein-Barr virus-specific serological data. *Jama* 237(8):781-785.
35. Fleisher G, Henle W, Henle G, Lennette ET, & Biggar RJ (1979) Primary infection with Epstein-Barr virus in infants in the United States: clinical and serologic observations. *The Journal of infectious diseases* 139(5):553-558.
36. Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-Traub N, Hanes RA, & Pagano JS (1984) Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *The New England journal of medicine* 310(19):1225-1230.
37. Niedobitek G, et al. (1997) Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *The Journal of pathology* 182(2):151-159.
38. Alfieri C, et al. (1996) Epstein-Barr virus transmission from a blood donor to an organ transplant recipient with recovery of the same virus strain from the recipient's blood and oropharynx. *Blood* 87(2):812-817.

39. Haque T, et al. (1996) Transmission of donor Epstein-Barr virus (EBV) in transplanted organs causes lymphoproliferative disease in EBV-seronegative recipients. *The Journal of general virology* 77 ( Pt 6):1169-1172.
40. Tanner J, Weis J, Fearon D, Whang Y, & Kieff E (1987) Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* 50(2):203-213.
41. Nemerow GR, Mold C, Schwend VK, Tollefson V, & Cooper NR (1987) Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *Journal of virology* 61(5):1416-1420.
42. Callan MF (2003) The evolution of antigen-specific CD8+ T cell responses after natural primary infection of humans with Epstein-Barr virus. *Viral immunology* 16(1):3-16.
43. Babcock GJ, Decker LL, Volk M, & Thorley-Lawson DA (1998) EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* 9(3):395-404.
44. Wagner HJ, Bein G, Bitsch A, & Kirchner H (1992) Detection and quantification of latently infected B lymphocytes in Epstein-Barr virus-seropositive, healthy individuals by polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology* 30(11):2826-2829.
45. Babcock GJ, Decker LL, Freeman RB, & Thorley-Lawson DA (1999) Epstein-barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *The Journal of experimental medicine* 190(4):567-576.
46. Savoie A, Perpete C, Carpentier L, Joncas J, & Alfieri C (1994) Direct correlation between the load of Epstein-Barr virus-infected lymphocytes in the peripheral blood of pediatric transplant patients and risk of lymphoproliferative disease. *Blood* 83(9):2715-2722.
47. Trappe R (2006) Pathogenese, Klinik, Diagnostik und Therapie transplantationsassoziiierter lymphoproliferativer Erkrankungen. *Deutsches Ärzteblatt* Jg 103, Heft 48:3259-3267.
48. Dipchand AI, et al. (2013) The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Sixteenth Official Pediatric Heart Transplantation Report--2013; focus theme: age. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 32(10):979-988.

49. Younes A & Samad N (2011) Utility of mTOR inhibition in hematologic malignancies. *The oncologist* 16(6):730-741.
50. Cullis B, et al. (2006) Sirolimus-induced remission of posttransplantation lymphoproliferative disorder. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 47(5):e67-72.
51. Krams SM & Martinez OM (2008) Epstein-Barr virus, rapamycin, and host immune responses. *Current opinion in organ transplantation* 13(6):563-568.
52. Nepomuceno RR, et al. (2003) Rapamycin inhibits the interleukin 10 signal transduction pathway and the growth of Epstein Barr virus B-cell lymphomas. *Cancer research* 63(15):4472-4480.
53. Baraldo M, Gregoraci G, & Livi U (2014) Steroid-free and steroid withdrawal protocols in heart transplantation: the review of literature. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 27(6):515-529.
54. Singh TP, et al. (2010) Safety and early outcomes using a corticosteroid-avoidance immunosuppression protocol in pediatric heart transplant recipients. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 29(5):517-522.
55. Davis MK & Hunt SA (2014) State of the art: cardiac transplantation. *Trends in cardiovascular medicine* 24(8):341-349.
56. Irving CA & Webber SA (2010) Immunosuppression therapy for pediatric heart transplantation. *Current treatment options in cardiovascular medicine* 12(5):489-502.
57. Di Filippo S, et al. (2003) Rabbit antithymocyte globulin as induction immunotherapy in pediatric heart transplantation. *Transplantation* 75(3):354-358.
58. Grundy N, et al. (2009) Pre-implantation basiliximab reduces incidence of early acute rejection in pediatric heart transplantation. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 28(12):1279-1284.
59. Birkeland SA & Hamilton-Dutoit S (2003) Is posttransplant lymphoproliferative disorder (PTLD) caused by any specific immunosuppressive drug or by the transplantation per se? *Transplantation* 76(6):984-988.
60. Parker A, et al. (2010) Diagnosis of post-transplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients - BCSH and BTS Guidelines. *British journal of haematology* 149(5):675-692.

61. Manlhiot C, et al. (2010) Post-transplant lymphoproliferative disorder in pediatric heart transplant recipients. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 29(6):648-657.
62. Jagadeesh D, Woda BA, Draper J, & Evens AM (2012) Post transplant lymphoproliferative disorders: risk, classification, and therapeutic recommendations. *Current treatment options in oncology* 13(1):122-136.
63. Dharnidharka VR, Lamb KE, Gregg JA, & Meier-Kriesche HU (2012) Associations between EBV serostatus and organ transplant type in PTLT risk: an analysis of the SRTR National Registry Data in the United States. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 12(4):976-983.
64. Chinnock R, et al. (2012) A 16-year multi-institutional study of the role of age and EBV status on PTLT incidence among pediatric heart transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 12(11):3061-3068.
65. Elidemir O, et al. (2009) Post-transplant lymphoproliferative disease in pediatric lung transplant recipients: recent advances in monitoring. *Pediatric transplantation* 13(5):606-610.
66. Quintini C, et al. (2006) Analysis of risk factors for the development of posttransplant lymphoproliferative disorder among 119 children who received primary intestinal transplants at a single center. *Transplantation proceedings* 38(6):1755-1758.
67. Opelz G & Dohler B (2004) Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4(2):222-230.
68. Katz BZ, et al. (2007) Case-control study of risk factors for the development of post-transplant lymphoproliferative disease in a pediatric heart transplant cohort. *Pediatric transplantation* 11(1):58-65.
69. Gao SZ, et al. (2003) Post-transplantation lymphoproliferative disease in heart and heart-lung transplant recipients: 30-year experience at Stanford University. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 22(5):505-514.

70. Schubert S, et al. (2009) Diagnosis and treatment of post-transplantation lymphoproliferative disorder in pediatric heart transplant patients. *Pediatric transplantation* 13(1):54-62.
71. Mendoza F, Kunitake H, Laks H, & Odum J (2006) Post-transplant lymphoproliferative disorder following pediatric heart transplantation. *Pediatric transplantation* 10(1):60-66.
72. Swerdlow SH (2008) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues Fourth Edition.441.
73. Hussein K, Tiede C, Maecker-Kolhoff B, & Kreipe H (2013) Posttransplant lymphoproliferative disorder in pediatric patients. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 80(6):289-296.
74. Mynarek M, Schober T, Behrends U, & Maecker-Kolhoff B (2013) Posttransplant lymphoproliferative disease after pediatric solid organ transplantation. *Clinical & developmental immunology* 2013:814973.
75. Tiede C, Maecker-Kolhoff B, Klein C, Kreipe H, & Hussein K (2013) Risk factors and prognosis in T-cell posttransplantation lymphoproliferative diseases: reevaluation of 163 cases. *Transplantation* 95(3):479-488.
76. Weiss LM & Chen YY (2013) EBER in situ hybridization for Epstein-Barr virus. *Methods in molecular biology* 999:223-230.
77. Caillard S, et al. (2012) Epidemiology of posttransplant lymphoproliferative disorders in adult kidney and kidney pancreas recipients: report of the French registry and analysis of subgroups of lymphomas. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 12(3):682-693.
78. Leblond V, et al. (1998) Posttransplant lymphoproliferative disorders not associated with Epstein-Barr virus: a distinct entity? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 16(6):2052-2059.
79. Luskin MR, et al. (2015) The Impact of EBV Status on Characteristics and Outcomes of Posttransplantation Lymphoproliferative Disorder. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*.
80. Quinlan SC, Pfeiffer RM, Morton LM, & Engels EA (2011) Risk factors for early-onset and late-onset post-transplant lymphoproliferative disorder in kidney recipients in the United States. *American journal of hematology* 86(2):206-209.
81. Murphy SB (1980) Classification, staging and end results of treatment of childhood non-Hodgkin's lymphomas: dissimilarities from lymphomas in adults. *Seminars in oncology* 7(3):332-339.

82. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, & Tubiana M (1971) Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer research* 31(11):1860-1861.
83. Murphy SB, Fairclough DL, Hutchison RE, & Berard CW (1989) Non-Hodgkin's lymphomas of childhood: an analysis of the histology, staging, and response to treatment of 338 cases at a single institution. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 7(2):186-193.
84. Gobbi PG, Ferreri AJ, Ponzoni M, & Levis A (2013) Hodgkin lymphoma. *Critical reviews in oncology/hematology* 85(2):216-237.
85. Al-Mansour Z, Nelson BP, & Evens AM (2013) Post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD): risk factors, diagnosis, and current treatment strategies. *Current hematologic malignancy reports* 8(3):173-183.
86. Singavi AK, Harrington AM, & Fenske TS (2015) Post-transplant lymphoproliferative disorders. *Cancer treatment and research* 165:305-327.
87. Nalesnik MA, et al. (1988) The pathology of posttransplant lymphoproliferative disorders occurring in the setting of cyclosporine A-prednisone immunosuppression. *The American journal of pathology* 133(1):173-192.
88. Allen U, Preiksaitis J, & Practice ASTIDCo (2009) Epstein-barr virus and posttransplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9 Suppl 4:S87-96.
89. Reshef R, et al. (2011) Reduction of immunosuppression as initial therapy for posttransplantation lymphoproliferative disorder( bigstar). *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 11(2):336-347.
90. Cleper R, et al. (2012) Post-transplantation lymphoproliferative disorder in pediatric kidney-transplant recipients - a national study. *Pediatric transplantation* 16(6):619-626.
91. McDonald RA, et al. (2008) Incidence of PTLD in pediatric renal transplant recipients receiving basiliximab, calcineurin inhibitor, sirolimus and steroids. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 8(5):984-989.
92. Uribe M, et al. (2009) Posttransplant lymphoproliferative disorder in pediatric liver transplantation. *Transplantation proceedings* 41(6):2679-2681.

93. Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, & Glennie MJ (2005) The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Current directions in autoimmunity* 8:140-174.
94. Choquet S, et al. (2006) Efficacy and safety of rituximab in B-cell post-transplantation lymphoproliferative disorders: results of a prospective multicenter phase 2 study. *Blood* 107(8):3053-3057.
95. Oertel SH, et al. (2005) Effect of anti-CD 20 antibody rituximab in patients with post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD). *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 5(12):2901-2906.
96. Milpied N, et al. (2000) Humanized anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab) in post transplant B-lymphoproliferative disorder: a retrospective analysis on 32 patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 11 Suppl 1:113-116.
97. Trappe R, et al. (2012) Sequential treatment with rituximab followed by CHOP chemotherapy in adult B-cell post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD): the prospective international multicentre phase 2 PTLD-1 trial. *The lancet oncology* 13(2):196-206.
98. Gross TG, et al. (2012) Low-dose chemotherapy and rituximab for posttransplant lymphoproliferative disease (PTLD): a Children's Oncology Group Report. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 12(11):3069-3075.
99. Gupta S, et al. (2010) Post-transplant lymphoproliferative disorder in children: recent outcomes and response to dual rituximab/low-dose chemotherapy combination. *Pediatric transplantation* 14(7):896-902.
100. Ped- PTLD 2005- Pilot: Prospective Study of Diagnosis and Treatment of Post-transplant Lymphoproliferative disease after Solid Organ Transplantation in Children (Medical School Hannover, Pediatric Hematology/ Oncology).
101. Picarsic J, et al. (2011) Post-transplant Burkitt lymphoma is a more aggressive and distinct form of post-transplant lymphoproliferative disorder. *Cancer* 117(19):4540-4550.
102. Yang F, Li Y, Braylan R, Hunger SP, & Yang LJ (2008) Pediatric T-cell post-transplant lymphoproliferative disorder after solid organ transplantation. *Pediatric blood & cancer* 50(2):415-418.
103. Maecker B, et al. (2007) CNS or bone marrow involvement as risk factors for poor survival in post-transplantation lymphoproliferative disorders in children

- after solid organ transplantation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25(31):4902-4908.
104. van de Glind G, et al. (2008) Intrathecal rituximab treatment for pediatric post-transplant lymphoproliferative disorder of the central nervous system. *Pediatric blood & cancer* 50(4):886-888.
  105. Patrick A, et al. (2011) High-dose intravenous rituximab for multifocal, monomorphic primary central nervous system posttransplant lymphoproliferative disorder. *Journal of neuro-oncology* 103(3):739-743.
  106. Cavaliere R, Petroni G, Lopes MB, Schiff D, & International Primary Central Nervous System Lymphoma Collaborative G (2010) Primary central nervous system post-transplantation lymphoproliferative disorder: an International Primary Central Nervous System Lymphoma Collaborative Group Report. *Cancer* 116(4):863-870.
  107. Haque T, et al. (2007) Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood* 110(4):1123-1131.
  108. Bollard CM, Rooney CM, & Heslop HE (2012) T-cell therapy in the treatment of post-transplant lymphoproliferative disease. *Nature reviews. Clinical oncology* 9(9):510-519.
  109. Icheva V, et al. (2013) Adoptive transfer of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1-specific T cells as treatment for EBV reactivation and lymphoproliferative disorders after allogeneic stem-cell transplantation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31(1):39-48.
  110. Hanto DW, et al. (1982) Epstein-Barr virus-induced B-cell lymphoma after renal transplantation: acyclovir therapy and transition from polyclonal to monoclonal B-cell proliferation. *The New England journal of medicine* 306(15):913-918.
  111. Perrine SR, et al. (2007) A phase 1/2 trial of arginine butyrate and ganciclovir in patients with Epstein-Barr virus-associated lymphoid malignancies. *Blood* 109(6):2571-2578.
  112. Shirley CM, et al. (2011) Bortezomib induction of C/EBP beta mediates Epstein-Barr virus lytic activation in Burkitt lymphoma. *Blood* 117(23):6297-6303.
  113. Bauer J, et al. (2001) Heart transplantation in children and infants: short-term outcome and long-term follow-up. *Pediatric transplantation* 5(6):457-462.
  114. Gotoh K, et al. (2010) Immunologic and virologic analyses in pediatric liver transplant recipients with chronic high Epstein-Barr virus loads. *The Journal of infectious diseases* 202(3):461-469.

115. Moran J, et al. (2011) Epstein-barr virus gene expression, human leukocyte antigen alleles and chronic high viral loads in pediatric renal transplant patients. *Transplantation* 92(3):328-333.
116. Ruf S, Behnke-Hall K, Gruhn B, Reiter A, & Wagner HJ (2014) EBV load in whole blood correlates with LMP2 gene expression after pediatric heart transplantation or allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation* 97(9):958-964.
117. Wagner HJ, et al. (2001) Patients at risk for development of posttransplant lymphoproliferative disorder: plasma versus peripheral blood mononuclear cells as material for quantification of Epstein-Barr viral load by using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Transplantation* 72(6):1012-1019.
118. Randhawa PS, et al. (1992) Expression of Epstein-Barr virus-encoded small RNA (by the EBER-1 gene) in liver specimens from transplant recipients with post-transplantation lymphoproliferative disease. *The New England journal of medicine* 327(24):1710-1714.
119. Dayton JD, et al. (2011) Role of immunosuppression regimen in post-transplant lymphoproliferative disorder in pediatric heart transplant patients. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 30(4):420-425.
120. Hayes D, Jr., et al. (2015) Influence of Posttransplant Lymphoproliferative Disorder on Survival in Children After Heart Transplantation. *Pediatric cardiology*.
121. Dharnidharka VR, Tejani AH, Ho PL, & Harmon WE (2002) Post-transplant lymphoproliferative disorder in the United States: young Caucasian males are at highest risk. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2(10):993-998.
122. Opelz G, Daniel V, Naujokat C, & Dohler B (2009) Epidemiology of pretransplant EBV and CMV serostatus in relation to posttransplant non-Hodgkin lymphoma. *Transplantation* 88(8):962-967.
123. Allen UD, et al. (2005) Risk factors for post-transplant lymphoproliferative disorder in pediatric patients: a case-control study. *Pediatric transplantation* 9(4):450-455.
124. Allen U, et al. (2001) Utility of semiquantitative polymerase chain reaction for Epstein-Barr virus to measure virus load in pediatric organ transplant recipients with and without posttransplant lymphoproliferative disease. *Clinical infectious*

- diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 33(2):145-150.
125. Orentas RJ, et al. (2003) Monitoring and modulation of Epstein-Barr virus loads in pediatric transplant patients. *Pediatric transplantation* 7(4):305-314.
  126. Riddler SA, Breinig MC, & McKnight JL (1994) Increased levels of circulating Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocytes and decreased EBV nuclear antigen antibody responses are associated with the development of posttransplant lymphoproliferative disease in solid-organ transplant recipients. *Blood* 84(3):972-984.
  127. Wadowsky RM, Laus S, Green M, Webber SA, & Rowe D (2003) Measurement of Epstein-Barr virus DNA loads in whole blood and plasma by TaqMan PCR and in peripheral blood lymphocytes by competitive PCR. *Journal of clinical microbiology* 41(11):5245-5249.
  128. Preiksaitis JK, et al. (2009) Interlaboratory comparison of epstein-barr virus viral load assays. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9(2):269-279.
  129. HA FJ, DE W, PD M, & Group atCS (2011) Collaborative study to evaluate the proposed 1st WHO International Standard for Epstein- Barr Virus (EBV) for nucleic acid amplification (NAT-) based assays. *WHO ECBS Report WHO/BS/11: 1-43.*
  130. Hertig A & Zuckermann A (2015) Rabbit antithymocyte globulin induction and risk of post-transplant lymphoproliferative disease in adult and pediatric solid organ transplantation: An update. *Transplant immunology* 32(3):179-187.
  131. Zuckermann A, et al. (2014) Thymoglobulin induction in heart transplantation: Patient selection and implications for maintenance immunosuppression. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation.*
  132. Swinnen LJ, et al. (1990) Increased incidence of lymphoproliferative disorder after immunosuppression with the monoclonal antibody OKT3 in cardiac-transplant recipients. *The New England journal of medicine* 323(25):1723-1728.
  133. Cherikh WS, et al. (2003) Association of the type of induction immunosuppression with posttransplant lymphoproliferative disorder, graft survival, and patient survival after primary kidney transplantation. *Transplantation* 76(9):1289-1293.
  134. Caillard S, Dharnidharka V, Agodoa L, Bohlen E, & Abbott K (2005) Posttransplant lymphoproliferative disorders after renal transplantation in the

- United States in era of modern immunosuppression. *Transplantation* 80(9):1233-1243.
135. Marks WH, Ilesley JN, & Dharnidharka VR (2011) Posttransplantation lymphoproliferative disorder in kidney and heart transplant recipients receiving thymoglobulin: a systematic review. *Transplantation proceedings* 43(5):1395-1404.
  136. Gajarski RJ, et al. (2011) Infection and malignancy after pediatric heart transplantation: the role of induction therapy. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 30(3):299-308.
  137. Schober T, et al. (2013) Characteristics of early and late PTLD development in pediatric solid organ transplant recipients. *Transplantation* 95(1):240-246.
  138. Sampaio MS, et al. (2012) Posttransplant malignancies in solid organ adult recipients: an analysis of the U.S. National Transplant Database. *Transplantation* 94(10):990-998.
  139. Pickhardt PJ, Siegel MJ, Hayashi RJ, & Kelly M (2000) Posttransplantation lymphoproliferative disorder in children: clinical, histopathologic, and imaging features. *Radiology* 217(1):16-25.
  140. Traum AZ, Rodig NM, Pilichowska ME, & Somers MJ (2006) Central nervous system lymphoproliferative disorder in pediatric kidney transplant recipients. *Pediatric transplantation* 10(4):505-512.
  141. Buell JF, et al. (2005) Posttransplant lymphoproliferative disorder: significance of central nervous system involvement. *Transplantation proceedings* 37(2):954-955.
  142. Castellano-Sanchez AA, et al. (2004) Primary central nervous system posttransplant lymphoproliferative disorders. *American journal of clinical pathology* 121(2):246-253.
  143. Gibson TM, et al. (2014) Risk of diffuse large B-cell lymphoma after solid organ transplantation in the United States. *American journal of hematology* 89(7):714-720.
  144. Clarke CA, et al. (2013) Risk of lymphoma subtypes after solid organ transplantation in the United States. *British journal of cancer* 109(1):280-288.
  145. Hussein K, Maecker-Kolhoff B, Klein C, & Kreipe H (2011) [Transplant-associated lymphoproliferation]. *Der Pathologe* 32(2):152-158.
  146. Quinlan SC, Landgren O, Morton LM, & Engels EA (2010) Hodgkin lymphoma among US solid organ transplant recipients. *Transplantation* 90(9):1011-1015.

147. Ghobrial IM, et al. (2005) Differences between early and late posttransplant lymphoproliferative disorders in solid organ transplant patients: are they two different diseases? *Transplantation* 79(2):244-247.
148. Vickers MA, et al. (2014) Establishment and operation of a Good Manufacturing Practice-compliant allogeneic Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic cell bank for the treatment of EBV-associated lymphoproliferative disease. *British journal of haematology* 167(3):402-410.
149. Gallot G, et al. (2014) T-cell therapy using a bank of EBV-specific cytotoxic T cells: lessons from a phase I/II feasibility and safety study. *Journal of immunotherapy* 37(3):170-179.
150. Gross TG, et al. (2005) Low-dose chemotherapy for Epstein-Barr virus-positive post-transplantation lymphoproliferative disease in children after solid organ transplantation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23(27):6481-6488.
151. Choquet S, Varnous S, Deback C, Golmard JL, & Leblond V (2014) Adapted treatment of Epstein-Barr virus infection to prevent posttransplant lymphoproliferative disorder after heart transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 14(4):857-866.
152. San-Juan R, et al. (2015) Current preventive strategies and management of Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disease in solid organ transplantation in Europe. Results of the ESGICH Questionnaire-based Cross-sectional Survey. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 21(6):604 e601-609.

## 9. Anhang

Tabelle: Übersicht der PTLD inklusive der Rezidive und Zweitumore

Patient	Alter bei HTX (in J.)	Abstand HTX-PTLD (in J.)	PTLD Lokalisation	Stadium	Histologie	EBV-Nachweis Tumor	EBV-Viruslast
1	4,5	0,7	ZNS	IV	monomorph (DLBCL)	positiv	hoch
2	0,1	10,6	Dünndarm, mediastinale LK	III	monomorph (Burkitt-Lymphom)	positiv	hoch
3	2,8	1,8	cervikale LK	I	polymorph	positiv	hoch
			Dünndarm, cervikale LK	III	monomorph (DLBCL)	positiv	hoch
			Lunge	III	keine Biopsie	nicht bekannt	hoch
4	1,1	0,5	ZNS, Dünndarm	IV	monomorph (DLBCL)	positiv	hoch
5	0,2	6,8	multifokale intraabdominelle LK	III	monomorph (T-Zell-PTLD)	nicht bekannt	nicht bekannt
6	0,1	12	Dünndarm	II	monomorph (Burkitt-Lymphom)	negativ	hoch
7	0,5	13,3	Lunge, multifokale intraabdominelle LK	III	polymorph	positiv	hoch
			Darm, multifokale intraabdominelle LK, mediast. LK	III	monomorph (DLBCL)	negativ	hoch
8	15,6	3,8	Tonsillen, cervikale LK	II	polymorph	positiv	nicht bekannt
			cervikale und mediastinale LK	IIA	Hodgkin Lymphom	positiv	hoch
9	0,5	7,7	cervik., mediast., multifokale intraabd. LK, Knochenmark	IV	Hodgkin Lymphom	positiv	hoch
			multifokale intraabdominelle LK	II	polymorph	nicht bekannt	hoch
10	13,5	12,2	Schilddrüse	I	polymorph	positiv	niedrig
11	0,1	8,6	cervik., mediast., multifokale intraabd. LK, Tonsillen	III	polymorph	positiv	hoch
			cervikale, mediastinale LK	IIA	Hodgkin Lymphom	positiv	hoch
12	0,8	7,8	cervik., mediast., multifokale intraabd. LK, Knochenmark	IV	monomorph (DLBCL)	positiv	hoch
13	0,2	14,2	cervik., mediast., multifokale intraabd. LK	IIIA	Hodgkin Lymphom	negativ	negativ
14	0,3	14,9	multifokale intraabdominelle LK	III	monomorph (DLBCL)	negativ	niedrig
15	0,3	6,2	cervikale, mediastinale LK	III	monomorph (T-Zell-PTLD)	nicht bekannt	nicht bekannt
16	0,2	6,6	cervikale LK	IIA	Hodgkin Lymphom	positiv	hoch
			Dickdarm, cervikale LK	III	monomorph (DLBCL)	positiv	niedrig
17	0,9	5,2	Dünndarm, multifokale intraabdominelle LK	III	monomorph (DLBCL)	positiv	hoch
18	0,2	6,5	cervikale LK	I	polymorph	positiv	hoch
			cervik., mediast., multifokale intraabd. LK	III	monomorph (DLBCL)	positiv	hoch
19	2,5	10,4	Leber	II	monomorph (DLBCL)	positiv	hoch
20	0,9	2,6	cervikale, multifokale intraabdominelle LK	III	polymorph	positiv	hoch
			cervikale, multifokale intraabdominelle LK	III	keine Biopsie	nicht bekannt	hoch
21	1	7,2	Tonsillen, cervikale LK	II	monomorph (DLBCL)	positiv	hoch

## Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Frankfurt, 15.09.2015

## **Danksagung**

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr J. Bauer und Frau Dr. K. Behnke-Hall für die Bereitstellung des Themas und für die nette und geduldige Betreuung!

Besonderer Dank geht auch an Herrn PD Dr. W. Wößmann und Frau Dr. S. Ruf aus der Abteilung für pädiatrische Hämatologie und Onkologie.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre moralische Unterstützung und ihre Geduld mit mir. Ein besonderes Dankeschön gilt meiner Schwester für das Korrekturlesen sowie Julian Kappich und Florian Teschner für ihre Ratschläge in statistischen Fragen.