

Aus dem Institut für Virologie  
der Universität zu Köln  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. F. Klein

**Die Dynamik der Torque Teno Virus Virämie als  
potentieller Indikator zur Vorhersage von  
Komplikationen nach der allogenen  
hämatopoetischen Stammzelltransplantation**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Ramona Gilles  
aus Neuwied

promoviert am 18. Juli 2022

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2022

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink  
1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. F. Klein  
2. Gutachter: Professor Dr. med. Dr. h. c. C. Scheid

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Dr. med. V. Di Cristanziano, Dr. rer. nat. R. Kaiser, Prof. Dr. med. C. Scheid, Dr. med. M. Herling, Priv.-Doz. Dr. med. U. Holtick

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die wesentlichen transplantationsbezogene Parameter wurden vom Institut für Innere Medizin I der Uniklinik Köln bereitgestellt. Die weitere Datenerhebung aus der Klinikdatenbank sowie deren Auswertung fand in Zusammenarbeit mit Dr. med V. Di Cristanziano statt.

Der laborchemische Virusnachweis auf CMV, EBV und BKPyV sowie die Quantifizierung der viralen DNA wurden ohne meine Mitarbeit im Labor des Instituts für Virologie durchgeführt. Der laborchemische Virusnachweis auf TTV sowie die Quantifizierung der viralen DNA wurden von mir selbst ausgeführt. Die benötigten Primersequenzen wurden von Prof. Dr. E. Puchhammer-Stöckl des Instituts für Virologie der Medizinischen Universität Wien zur Verfügung gestellt.

Die weitergehende Auswertung der gewonnenen Daten wurde, begleitet von beratenden Gesprächen mit den genannten Koautoren, von mir selbst durchgeführt. Die statistische Analyse führte ich eigenständig mit der SPSS 23.0 Software aus.

## Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 24/2011) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 19. Mai 2021

Unterschrift:  .....

## **Danksagung**

Hiermit möchte ich mich für die freundliche Unterstützung beim gesamten Team des Instituts für Virologie sowie bei den Mitarbeitern der Klinik I für Innere Medizin bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Univ.-Prof. Dr. med. F. Klein und Dr. med V. Di Cristianzano für die Bereitstellung des Themas, der Unterstützung bei der Umsetzung und der hervorragenden Betreuung. Die zahlreichen Dialoge mit Frau Dr. med V. Di Cristianzano auf fachlicher und persönlicher Ebene werden mir als bereichernder und konstruktiver Austausch in Erinnerung bleiben.

Außerdem danke ich Claudia Müller zutiefst für ihre große sachliche und emotionale Unterstützung während meiner Studienzzeit und der Erstellung dieser Arbeit. Ihr menschlicher Beistand gab mir stets Kraft und Mut auf diesem Weg.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Partner für ihre Geduld, ihre liebevolle Fürsorge und ihren unerschütterlichen Glauben an mich. Ihre fortwährenden Zusprüche motivierten mich auf dem langen Weg zur Verwirklichung meines Traums.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>6</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>8</b>
<b>2 EINLEITUNG</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Stammzelltransplantation</b>	<b>9</b>
2.1.1 Geschichte	9
<b>2.2 Prinzip</b>	<b>10</b>
2.2.1 Die hämatopoetische Stammzelle	10
2.2.2 Stammzellquelle	10
2.2.3 Arten der Stammzellspende	11
2.2.4 Spenderauswahl	12
2.2.5 Indikationen der allogenen Stammzelltransplantation	12
2.2.6 Konditionierungstherapie	13
<b>2.3 Ablauf der allogenen Stammzelltransplantation</b>	<b>14</b>
<b>2.4 Komplikationen nach allogener HSZT</b>	<b>15</b>
2.4.1 Graft-versus-Host-Disease	15
2.4.2 Infektionen	18
2.4.2.1 Allgemeines	18
2.4.2.2 Cytomegalie-Virus	19
2.4.2.3 BK-Polyomavirus	20
2.4.2.4 Epstein-Barr-Virus	20
2.4.2.5 Torque Teno Virus	21
<b>2.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit</b>	<b>23</b>
<b>3 PUBLIKATION</b>	<b>25</b>
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>34</b>
<b>4.1 Zur klinischen Gegebenheit</b>	<b>34</b>
<b>4.2 Dynamik der Virus-Reaktivierung</b>	<b>35</b>
	<b>4</b>

<b>4.3</b>	<b>Bedeutung der Analyse für die allogene Stammzelltherapie</b>	<b>37</b>
<b>4.4</b>	<b>Limitationen</b>	<b>38</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG</b>	<b>47</b>
<b>6.1</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>47</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATG	Antithymozytenglobulin
BKPyV	BK-Polyomavirus
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
CMV	Cytomegalie-Virus
CTL	cytotoxic T Imphocyte
DNA	desoxyribonucleic acid
EBV	Epstein-Barr-Virus
et al.	et alii
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
GvHD	Graft-versus-Host Disease
Gy	Gray
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
HC	hemorrhagic cystitis
HHV-6	Humanes Herpesvirus 6
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HSV	Herpes-simplex-Virus
HSZ	hämatopoetische Stammzelle
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
i.v.	intravenös
kb	Kilobase
KM	Knochenmark
MA	myeloablativ
MHC	Major Histocompatibility Complex
MUD	matched unrelated donor
MMUD	mismatched unrelated donors
NMA	Nicht-myeloablativ
NK-Zellen	Natürliche Killerzelle
nt	Nukleotid(e)
PTLD	Post-Transplantat Lymphoproliferative Disorder
ORF	Offener Leserahmen
p.o.	per os
PBMC	peripheral blood mononuclear cell

PBSC	peripheral blood stem cell
PCR	polymerase chain reaction
RSV	Respiratorisches Syncytial-Virus
SIB	matched sibling
TTV	Torque Teno Virus
μ	mikro
u.a.	unter anderem
UTR	untranslated region
vs.	versus
VZV	Varicella-Zoster-Virus
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZKRD	Zentrales Knochenmarkspende-Register

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird im Folgenden auf die gleichzeitige Verwendung weiblicher und männlicher Sprachformen verzichtet und das generische Maskulinum verwendet, wenn ein Oberbegriff gemeint ist (z.B. Patient) und sofern es sich nicht um Zitate handelt. Als Oberbegriff verwendete maskuline Bezeichnungen schließen also ebenfalls weibliche Personen mit ein.

# 1 Zusammenfassung

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) ist eine etablierte Behandlungsoption für eine Vielzahl hämatologischer Erkrankungen. Die Zeit nach der Transplantation wird dennoch häufig durch Komplikationen wie Infektionen und Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit (GvHD) erschwert. Die Zeit kann dabei als dehnbare Abschnitt gesehen werden, oftmals erfordern chronische Langzeitfolgen lebenslange Überwachung. Das Konditionierungsschema vor der Transplantation und die immunsuppressive Therapie nach der HSZT verursachen ein eingeschränktes Immunsystem des Stammzell-Empfängers, das zu einem schweren und oft lang andauernden Immundefekt führen kann.

Die Verbesserung der immunologischen Überwachung könnte beschriebene Komplikationen minimieren. Diese Arbeit schlägt als mögliche Strategie zur Analyse der Immunsystemfunktionalität nach allogenen HSZT die Überwachung der TTV-Kinetik nach der Transplantation vor. Das Torque Teno Virus (TTV) ist ein nicht behülltes Anellovirus mit einer zirkulären einzelsträngigen DNA von etwa 3,8 kb, und einer weiten Verbreitung in der Allgemeinbevölkerung. Es gilt bislang als nicht pathogen, der Zusammenhang zu klinischen Manifestationen ist nicht bekannt. Nach bisherigen Kenntnissen kann das Virus als ein wertvoller Marker zur funktionellen Bewertung der Immunrestitution bei immungeschwächten Patienten dienen.

In dieser Studie wurde die TTV-Kinetik analysiert, um die TTV-Virämie als potentieller Biomarker der Immunkompetenz nach allo-HSZT zu identifizieren. 23 Patienten, die zwischen November 2014 und April 2015 am Universitätsklinikum Köln eine allogene Stammzelltransplantation erhielten, wurden retrospektiv auf TTV-DNA getestet. Die virale Quantifizierung fand zu festgelegten Zeitpunkten nach der Transplantation aus Vollblutproben statt. Die Dynamik der TTV-Virämie wurde in Bezug zu Nicht-TTV-Virusreaktivierungen (CMV, EBV und BKPyV), akute GvHD und Generierung von Immunzellen gesetzt.

Jene Stammzellempfänger, die von anhaltenden Virusinfektionen und/oder GvHD während der ersten 100 Tage nach allo-HSZT betroffen waren (Hochrisikogruppe), zeigten eine signifikant höhere mittlere TTV-Belastung am Tag +30 als Patienten mit einem weniger komplizierten klinischen Verlauf (Niedrigrisikogruppe) ( $p=0,005$ ).

Als Merkmal eingeschränkter Immunregeneration mit gesteigertem Komplikationsrisiko zeigten die Hochrisikopatienten an Tag +30 eine signifikant geringere Zellzahl der Lymphozyten als Patienten der Niedrigrisikogruppe. Eine Gesamtlymphozytenzahl von weniger als  $5,5E+08$  Zellen/L assoziierte mit der Zugehörigkeit zur Hochrisikogruppe ( $p=0,039$ ).

Entsprechend der hier aufgeführten Resultate, empfiehlt sich das Screening auf TTV-DNA in der Posttransplantationsphase. Die Ergebnisse legen nahe, dass TTV einen zusätzlichen

Parameter darstellen könnte, Patienten mit einem höheren Risiko für Komplikationen in den ersten 100 Tagen nach allo-HSZT zu identifizieren. Prospektive Studien, einschließlich die Überwachung von Lymphozyten-Untergruppen, sind erforderlich, um die potenzielle Verwendung von TTV bei der immunologischen Überwachung nach allo-HSZT zu verifizieren. Patienten mit erhöhtem Risikoprofil, eine bedrohliche Komplikation zu entwickeln, könnten so von prophylaktischer Therapie oder frühzeitiger Therapiemodulation profitieren.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Stammzelltransplantation**

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) stellt ein Verfahren dar, bei dem einem Empfänger hämatopoetische Stammzellen eines beliebigen Spendertyps und einer beliebigen Quelle verabreicht werden, um das fehlende, dysfunktionelle oder maligne entartete lymphohämatopoetische System des Empfängers durch ein Hämatopoese-Immunsystem eines gesunden Spenders zu ersetzen<sup>1</sup>.

#### **2.1.1 Geschichte**

Das Gebiet der Knochenmarktransplantation hat sich über einen Zeitraum von nun mehr als 60 Jahren weiterentwickelt. Angeregt durch die anhaltende nukleare Bedrohung zum Ende des Zweiten Weltkrieges begannen Wissenschaftler Möglichkeiten zum Schutz des Menschen vor Bestrahlung zu erforschen. Im Jahr 1949 machten Jacobson und Kollegen im Mausversuch die Beobachtung, dass die Abschirmung der Milz mittels Bleifolie das Überleben einer Ganzkörperbestrahlung in letaler Strahlendosis sichern konnte<sup>2</sup>. Das Überleben derart bestrahlter Mäuse konnte ebenso durch die Infusion von Milz- oder Knochenmarkszellen erzielt werden<sup>2,3</sup>. Später wurde mit dem Konzept der Bestrahlung, zur therapeutischen Eliminierung von leukämischen Zellen, die Verwendung von Konditionierungsschemata für eine erfolgreiche Transplantation in die Klinik eingeführt. 1957 führte Edward Donnall Thomas erstmalig die Knochenmarkstransplantation an einem Patienten durch. Er konditionierte die Patienten mit Ganzkörperbestrahlung und/oder hochdosierter Chemotherapie, um die Grunderkrankung zu eradizieren, und infundierte dann Knochenmarkszellen, was zu einer hämatologischen Rekonstitution führt<sup>4,5</sup>. Erst durch zahlreiche Studien und der Erkenntnis der humanen Leukozytenantigene (*human leukocyte antigen*, HLA) als zentraler Einflussfaktor bei der HSZT verbesserten sich die Ergebnisse der Transplantation. Das gewonnene Wissen über die Bedeutung des HLA-Systems und hierdurch die verbesserte Strategie zur Spenderauswahl erreichte 1968 erfolgreiche allogene HSZT bei malignen hämatologischen Erkrankungen<sup>6,7</sup>.

1990 wurde E. D. Thomas und J. E. Murray für ihre Entdeckungen bezüglich der Zell- und Organtransplantation bei der Behandlung menschlicher Erkrankungen der Nobelpreis für Medizin und Physiologie verliehen.

Die HSZT konnte sich inzwischen durch Erweiterung der Indikationsstellung zunehmend etablieren. Die Zahl der vollzogenen Transplantationen wächst jährlich stetig. Während 1990 für Europa noch 4.234 HSZTs an 143 Zentren in 20 europäischen Ländern verzeichnet wurden<sup>8</sup>, betrug die Anzahl der Transplantationen 2019 bereits 48.512 an 700 Zentren in 51 europäischen und angeschlossenen Ländern<sup>9</sup>.

## **2.2 Prinzip**

### **2.2.1 Die hämatopoetische Stammzelle**

Die pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) besitzen die Fähigkeit der Selbsterneuerung und Differenzierung in die sogenannten Progenitorzellen. Diese charakterisieren die Vorläuferzellen aller zellulären Blutbestandteile. Der Sitz der pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ist der Knochenmarksraum. Daneben befinden sie sich, zu einem jedoch wesentlich geringeren Anteil, im peripheren Blut oder im frischen Nabelschnurblut. Das CD34-Antigen ist ein Glycoprotein, welches von hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird und sich auf deren Zelloberfläche befindet. Das Antigen kann im klinischen Alltag als Marker dienen, so z.B. zur Leukämiediagnostik, aber auch bei der immunologischen Reinigung für die Transplantation<sup>10,11</sup>.

### **2.2.2 Stammzellquelle**

Initial galt das Knochenmark (KM) als Standard-Stammzellquelle. Die Gewinnung der hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks gelingt durch Punktion des hinteren Beckenkamms und nachfolgender Aspiration des blutbildenden Gewebes.

Seither hat die Transplantation peripherer Stammzellen (PBSC) an Bedeutung gewonnen und gilt inzwischen als Haupt-Stammzellquelle<sup>12</sup>. Die Mobilisierung der Stammzellen erfolgt durch einen hämatopoetischen Wachstumsfaktor, der sogenannte Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (*granulocyte-colony stimulating factor*, G-CSF), sodass der starke Zuwachs der Stammzellen im peripheren Blut es ermöglicht, sie für therapeutische Maßnahmen mittels Leukapharese zu sammeln<sup>13</sup>. Mobilisierte PBSC-Präparate enthalten - verglichen mit Knochenmarkspräparaten - durchschnittlich das 3-4-fache an CD34+-Zellen und 10-mal mehr Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen<sup>14</sup>. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Immunrestitution bei Wachstumsfaktor-stimulierten-peripheren Stammzellen im Vergleich zur Knochenmark-Transplantation schneller verläuft<sup>15,16</sup>. Anasetti et al. legten jedoch in einer prospektiven randomisierten Studie 2011 dar, dass der Einsatz von peripheren Blutstammzellen anstelle von Knochenmarkstammzellen bei der Fremdspender-

transplantation zu einem höheren chronischen GvHD-Risiko, bei vergleichbarer Anzahl an aufgetretener akuter GvHD, führt<sup>17</sup>. Für eine allogene Transplantation sollte eine Mindestdosis von  $4 \times 10^6$  CD34-positiven Zellen/kg Körpergewicht des Empfängers und bei autologen Transplantationen von  $2 \times 10^6$ /kg Körpergewicht angestrebt werden<sup>18</sup>.

Stammzellen können auch aus Nabelschnurvenenblut gewonnen werden. Da die gesammelten Zellzahlen häufig zu gering sind, um das stabile Anwachsen des Transplantats (*Engraftment*) sicherzustellen, präsentiert sie eine selten genutzte Quelle. Diese Transplantationen sind, neben einem zeitlich verzögerten Engraftment, mit einem geringeren Risiko an GvHD verknüpft<sup>19</sup>.

### **2.2.3 Arten der Stammzellspende**

Es wird zwischen zwei verschiedenen Typen von Stammzelltransplantationen unterschieden, die autologe und die allogene. Die Bezeichnung beschreibt jeweils das Verhältnis zwischen Patient und Spender. Bei der autologen HSZT werden vorab gesammelte patienteneigene Stammzellen z. B. nach Chemo- oder Strahlentherapie reinfundiert. Dieses Therapieschema stellt sich als besonders vorteilhaft dar, da nach der Transplantation keine Immunsuppression erforderlich ist sowie keine Graft-versus-Host-Erkrankungen (*graft versus host disease*, GvHD) auftreten. Da kein Spender bereitgestellt werden muss, erleichtert dies das gesamte Prozedere der Transplantation. Im Vergleich zur allogenen HSZT wird allerdings durch das Ausbleiben eines Graft-versus-Leukemia-Effekts sowie der möglichen Kontamination mit Tumorzellen das Rezidivrisiko erhöht. Durch Reinigen des Transplantats (*Purging*) wird versucht, Letzterem entgegen zu wirken. Der Wirkmechanismus basiert bei diesem Therapiekonzept auf der Anti-Tumor-Wirkung der Hochdosischemotherapie.

Bei einer allogenen Transplantation werden immer körperfremde Zellen übertragen. Durch das Auftreten von Abstoßungsreaktionen gegen das Transplantat oder aber Transplantat-gegen-Empfänger-Reaktionen sind immunsuppressive Therapien notwendig. Dies hat eine verzögerte Immunrekonstitution zur Folge und impliziert mithin eine erhöhte Infektionsgefahr. Aus diesem Grund ist die allogene Transplantation mit erheblich gravierenderen therapiebedingten Komplikationen verbunden. Die Anti-Leukämische Wirkung (*Graft-versus-leukemia*) als wünschenswerter Effekt wird weniger der Konditionierung, mehr der allogenen HSZT zugeschrieben. Die Bereitstellung von allogenen HSZ erfordert ein umfangreiches komplexes Prozedere der Spendersuche, das in Deutschland durch ein zentrales Register (ZKRD) koordiniert wird.

## 2.2.4 Spenderauswahl

Die Voraussetzung für eine erfolgreiche allogene Stammzelltransplantation ist die Gewebeverträglichkeit von Spender und Empfänger. Die Bestimmung dieser Histokompatibilität wird mittels Typisierung der humanen Leukozytenantigene durchgeführt.

Das HLA-System dient dem Immunsystem, zwischen körpereigenen und körperfremd zu unterscheiden<sup>20</sup>. Es ist das polymorphste genetische System des Menschen. Die individuellen HLA-Merkmale des Menschen werden durch Gene im Bereich der Haupthistokompatibilitätskomplex-Region (*major histocompatibility complex*, MHC, beim Menschen auch als HLA-Antigene bezeichnet) auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 kodiert und lassen sich topographisch und funktionell in drei Klassen mit weiteren Isotypen unterteilen. Für die Transplantation sind nur Klasse-I mit HLA-A, -B, -C und Klasse-II mit HLA-DR und -DQ von Bedeutung<sup>21</sup>. Der doppelte Chromosomensatz bedingt, dass jeder Mensch für jedes HLA-Merkmal jeweils zwei Allele besitzt, d.h. 5x2 relevante HLA-Merkmale für die Transplantation. Die vollständige Übereinstimmung dieser 5 Isotypen würde einem in 10 von 10 Allelen gematchten Spender entsprechen.

Während Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche beinahe aller kernhaltigen Zellen exprimiert werden, finden sich Klasse-II-Moleküle nur auf Antigen-präsentierenden Zellen, wie B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen.

Die HLA-Gene sind eng miteinander verbunden und das gesamte MHC wird von beiden Elternteilen auf Mendelsche Weise als gekoppeltes Set (HLA-Haplotyp) vererbt. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Geschwister HLA-identisch sind beträgt 25%<sup>22</sup>. Daher erfolgt - wenn eine allogene Transplantation indiziert ist - zunächst eine Familienspendersuche. Liegt innerhalb der Familie kein kompatibler Spender vor, findet die Einleitung der internationalen Suche nach einem HLA-kompatiblen, nicht verwandten Spender in einer akkreditierten Sucheinheit statt. Umfangreiche Daten aus Transplantationszentren und Transplantationsregistern bestätigten, dass das GvHD- und Abstoßungsrisiko vom Grad der Übereinstimmung in den HLA-Molekülen abhängig ist<sup>23-25</sup>. Für rund ein Drittel der Patienten steht ein histokompatibler Familienspender zur Verfügung. Die verbleibenden zwei Drittel der Patienten erfordern die Suche nach einem passenden nicht verwandten Spender (*Matched unrelated donor*, MUD). Die Erfolgsrate der Suche eines passenden Donors steigt durch den Ausbau der Spenderregister von Jahr zu Jahr<sup>26</sup>.

## 2.2.5 Indikationen der allogenen Stammzelltransplantation

Im Allgemeinen repräsentiert die allogene Stammzelltransplantation eine Therapieoption, sobald sie eine potenziell bessere Prognose verspricht als die therapeutische Alternativtherapie. Die Bewertung des kurativen Potenzials der HSZT findet unter dem Gesichtspunkt der Risiken therapiebedingter Morbidität und Mortalität statt<sup>27</sup>. Entscheidend

sind neben der Diagnose auch die individuellen Parameter des Patienten wie Alter und Vorerkrankungen als auch die transplantationsspezifischen Faktoren wie Spenderverfügbarkeit bei der Indikationsstellung.

Sowohl maligne als auch nichtmaligne Erkrankungen des blutbildenden Systems können die Indikationen zur allogenen HSZT stellen. Zu den Standardindikationen zählen je nach Erkrankungsstadium und verfügbarem Spender die akute und chronische lymphatische Leukämie (ALL, CLL), die akute und chronische myeloische Leukämie (AML, CML), T- und B-Zell Lymphome, das myelodysplastische Syndrom (MDS), die Primäre Myelofibrose (PMF) sowie bei den hämatopoetischen Insuffizienzen nicht-maligner Genese die aplastischen Anämien (AA) und die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH). Aktuelle Empfehlungen und Details sind der Leitlinie zur allogenen Stammzelltransplantation von der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation (DAG-KBT) zu entnehmen.

### **2.2.6 Konditionierungstherapie**

Unter Konditionierung versteht man die der eigentlichen Stammzelltransplantation vorgeschaltete mehrtägige Behandlung. Die Konditionierung vereinigt drei Funktionen. Sie wirkt immunsuppressiv, um eine Transplantatabstoßung zu verhindern, sie wirkt myeloablativ um „Platz“ für die transplantierten HSZ bereitzustellen und sie soll – mit unterschiedlicher Intensität – maligne Zellen abtöten.

Bestimmend für die Auswahl der Konditionierungsintensität ist, neben dem für die Krankheit bestimmte Graft-versus-Tumor-Effekt, auch die Komorbiditäten, das Alter, der Remissionsstatus vor Transplantation und das Rezidivrisiko. Diese Vielzahl an Einflussgrößen lässt keine einheitlichen Konditionierungsstandards zu, sondern erfordert ein individuelles Anpassen. Die Intensitäten lassen sich pauschal in myeloablatives (MA), nicht-myeloablatives (NMA) und intensitätsreduziertes (RIC) Regime eingruppierten<sup>28</sup>.

Das myeloablative Regime – die Standardkonditionierung – wird mit Zytostatika, wie Cyclophosphamid, Busulfan, Etoposid oder Fludarabin (allein oder kombiniert) mit oder ohne Ganzkörperbestrahlung ( $\geq 5\text{Gy}$  Einzeldosis oder  $\geq 8\text{ Gy}$  fraktioniert) durchgeführt<sup>28</sup>. Es verursacht eine derartige Schädigung der Knochenmark- und Immunsystemfunktion, so dass eine Rekonstitution der patienteneigenen Hämatopoese ausbleibt. Eine anschließende Stammzellgabe ist daher unvermeidlich, um dem Patienten ein Überleben der Konditionierung zu gewährleisten.

Das nicht-myeloablative Regime erzeugt nur eine geringfügige Hämatotoxizität und lässt daher die anschließende autologe Rekonstitution des hämatopoetischen Systems zu. Das Anwachsen von Spender-Stammzellen und damit das Ersetzen des patienteneigenen Systems wird durch die ausreichend immunsuppressive Wirkung möglich. Eine bessere

Verträglichkeit und niedrigere therapieassoziierte Sterblichkeit führen dazu, dass das Anwendungsgebiet der HSZT mit dieser Konditionierung auf Patienten erweitert werden kann, welche sich ansonsten nicht für eine konventionelle myeloablative Behandlung qualifiziert hätten (z.B. Ältere oder Patienten mit schweren Komorbiditäten)<sup>29</sup>. Es basiert auf einem Therapieregime, das eine minimale Zytopenie hervorruft. Beispiele für NMA-Therapien sind: Fludarabin+Cyclophosphamid<sup>30</sup>, Ganzkörperbestrahlung mit < 2Gy<sup>31,32</sup>, Gesamtlymphoidbestrahlung+Antithymozytenglobulin (ATG)<sup>33</sup>.

Bei dem intensitätsreduzierten System ist die Dosis der Chemo- bzw. Bestrahlungstherapie um mindestens 30% reduziert<sup>28</sup>. Es erfüllt weder die Konditionierungsschemata der MA noch der NMA.

### **2.3 Ablauf der allogenen Stammzelltransplantation**

Die allogene HSZT gliedert sich in mehrere Abschnitte.

Im Vorfeld erfolgen die Spendersuche und Spenderauswahl primär anhand von HLA-Identität. Bei erfolgreicher Auswahl wird die Konditionierungstherapie durchgeführt, die den Empfänger für die Transplantation des Blutstammzellpräparats vorbereitet.

Unmittelbar im Anschluss erfolgt die Stammzellgewinnung durch Aphaese peripherer Blutstammzellen des Donors nach G-CSF Behandlung oder Knochenmarkentnahme.

Es schließt sich die Transplantation der Stammzellen an (Tag 0). Die Tage, die auf die Transplantation folgen, werden entsprechend mit einem Pluszeichen beschrieben. Bei dem Vorgang der Transplantation werden die Zellen über einen zentralen Venenkatheter in das venöse System infundiert. Die Stammzellen verlassen die Blutbahn und siedeln sich in den leeren Knochenmarksnischen an.

Das Engraftment bezeichnet das erfolgreiche Anwachsen des Transplantats in den Knochenmarkszwischenräumen und die einsetzende Neuproduktion der hämato- und lymphopoetischen Zellen. Das erfolgreiche Engraftment definiert sich dadurch, dass die Neutrophilenzahl an 3 aufeinanderfolgenden Tagen stabil über 500/ $\mu$ L<sup>34</sup> und die Thrombozytenzahl (an mind. 7 aufeinanderfolgenden Tagen und ohne Verabreichung von Thrombozytenkonzentraten) stabil bei über 20.000/ $\mu$ L<sup>35</sup> liegt.

In Abhängigkeit von dem Konditionierungsverfahren und der verwendeten Stammzellquelle erfordert das Engraftment eine unterschiedlich lange Zeitspanne. Das Zeitintervall bis die neutrophilen Granulozyten den Grenzwert erreichen, beträgt je nach Literatur zwischen +9 bis +19 Tage bei PBSCs und +15 bis +25 Tage bei KM<sup>36-38</sup>. Das Engraftment der Thrombozyten zeigt sich laut Literatur bei Erhalt von PBSCs an Tag +10 bis +16, bei KM-Transplantation an Tag +18 bis +30<sup>36-39</sup>.

Für die quantitative und funktionelle Rekonstitution des adaptiven Immunsystems (T- und B-Zellen) vergeht eine deutlich längere Zeit<sup>40</sup>.

Für die T-Zell-Rekonstitution existieren zwei verschiedene Wege. Sie geht zunächst aus der Thymus-unabhängigen peripheren Expansion hervor. Diese T-Zellen setzen sich zusammen aus restlichen Wirts-T-Zellen, die die Konditionierung überlebt haben, und reifen Spender-T-Zellen. Letztere wurden über ein Stammzellen-Allotransplantat übertragen oder gezielt als Spender-Lymphozyten-Infusion verabreicht<sup>41</sup>.

Neue naive T-Zellen werden zeitverzögert aus hämatopoetischen Stammzellen in einem Thymus-abhängigen Regenerationsmechanismus erzeugt. Die Stromazellen des Thymus unterstützen die Differenzierung von Nachkommen der eingewanderten, undifferenzierten in reife T-Zellen<sup>42</sup>. Da dieser Mechanismus von funktionsfähigem Thymusgewebe abhängig ist, sinkt die Funktionsfähigkeit mit steigendem Alter. Die altersbedingte protrahierte Immunrekonstitution betrifft im Speziellen die CD4+ T-Zellen, die sich nach den CD8+ T-Zellen erholen, da ihre Generierung stärker auf der Produktion im Thymusgewebe basiert. Daraus ergibt sich eine Inversion des CD4+/CD8+-Quotienten<sup>40</sup>.

In der Regel erfolgt die Wiederherstellung der B-Zellzahl innerhalb von 12 Monaten nach HSZT. Die Funktionalität der Zellen bleibt in den ersten 2 Jahren beeinträchtigt. Dies führt zu einem langen Defizit der B-Zell-vermittelten Immunität<sup>43</sup>.

Unter Berücksichtigung dieser Gegebenheiten, liegt es nahe, dass auch bei Vorliegen numerisch physiologischer Blutwerte nicht unweigerlich von einer adäquaten Immunkompetenz ausgegangen werden kann. Die Patienten unterliegen einem erhöhten Risiko für schwer verlaufende bakterielle, Pilz- und Virusinfektionen.

## **2.4 Komplikationen nach allogener HSZT**

Nach einer allogenen Stammzelltransplantation sind die Patienten durch eine Vielzahl zum Teil schwerwiegender Komplikationen gefährdet. Zu den häufigsten gehören das Rezidiv der Grunderkrankung, das Transplantat-Versagen, die Graft-versus-Host-Erkrankung und die transplantationsassoziierten Infektionen.

Die beiden zuletzt genannten erfordern gegensätzliche Modellierung des Immunsystems. Daher bedarf es die optimale Balance zu finden zwischen der Immunsuppression als Abstoßungsprophylaxe einerseits und die Förderung des neuentstehenden Immunsystems zur Abwendung von Infektionen andererseits.

### **2.4.1 Graft-versus-Host-Disease**

Alloreaktive T-Lymphozyten des Donors erkennen abweichende Histokompatibilitätsantigene im Empfänger und schädigen das Gewebe. Diese systemisch entzündliche Erkrankung wird als Graft-versus-Host Erkrankung (*Graft-versus-Host-Disease*, GvHD) bezeichnet und wird in akute und chronische Form unterschieden. Die frühere, strikte Trennung der akuten von der chronischen Form, basierte auf dem Manifestationszeitpunkt nach der Transplantation (mehr

oder weniger als 100 Tage nach der Transplantation). Diese Einteilung, stützend auf dem Manifestationszeitpunkt rückt mehr in den Hintergrund. Aktuell wird eine Definition genutzt, die mehr auf die Symptome typischer akuter und chronischer GvHD-Manifestationen ausgerichtet ist<sup>44</sup>.

In geringem Ausmaß kann eine GvHD erwünscht sein, um den Graft-versus-Leukemia-Effekt zu erreichen. Der ausbleibende Graft-versus-Leukemia- bzw. Graft-versus-Lymphoma-Effekt führt zum Anstieg der Rezidivrate<sup>45</sup>.

Eine ausgeprägtere GvHD stellt jedoch eine signifikante Ursache der Morbidität und Mortalität in allogenen HSZT Empfängern dar.

Die akute Form (aGvHD) tritt bevorzugt in den ersten Wochen und Monaten (laut ehemaliger Definition bis Tag +100) nach Transplantation auf. 30% - 60% aller allogenen Stammzellempfänger sind betroffen, in 15-30% führt es zum Tod<sup>46,47</sup>. Klinisch manifestiert sich die aGvHD an der Haut (Exanthem, Erythrodermie, Desquamation), an der Leber (Bilirubinanstieg mit Ikterus) und am Darm (Diarrhoe, Tenesmen, Dyspepsie, Anorexie, Ileus). Für die Entstehung der aGvHD ist eine Vielzahl von Risikofaktoren bekannt, die bei der Prognoseeinschätzung und Prophylaxeplanung beachtet werden müssen. Einige Beispiele seien hier genannt: HLA-Mismatch, Geschlechtsheterogenität zwischen Spender und Empfänger (insbesondere weiblicher Donor für einen männlichen Empfänger), Ganzkörperbestrahlungen, Infektionen, weiblicher Spender mit vorangegangener Schwangerschaft, Stammzellquelle: Blutstammzellen > Knochenmark > Nabelschnurblut, Anzahl der T-Lymphozyten im Transplantat bei HLA-Mismatch Situation, reduzierte immunsuppressive Prophylaxe.

Zu Beginn der aGvHD steht eine Gewebeschädigung durch das Konditionierungsregime und die damit einhergehende generalisierte Immunreaktion mit Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen<sup>48,49</sup>. Nach Transplantation werden T-Lymphozyten des Spenders durch Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers aktiviert und zur klonalen Expansion stimuliert. Im Folgenden führt dies erneut zur Expression proinflammatorischer Zytokine und deren Rezeptoren, die den „Zytokinsturm“ intensivieren. Hauptakteure sind dabei Interleukine wie IL-1, -2, -17, 22 und -23, der Tumor-Nekrose Faktor und Interferon-gamma<sup>50</sup>. Schließlich folgt die T-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegen die Empfängerzellen mit Gewebeerstörung in den Zielorganen durch Apoptoseinduktion<sup>51</sup>.

Die Einstufung des aGvHD Gesamtschweregrades erfolgt in vier Grade von leicht bis lebensbedrohlich. Die Einteilung basiert auf der Schweregradbeurteilung für jedes einzelne der Hauptmanifestationsorgane Haut, Darm und Leber. Dies wird gemessen an dem klinischen Bild der Haut, dem Diarrhoevolumen und dem Bilirubinwert.

Die chronische Form (cGvHD) ist eine verzögert einsetzende Reaktion des Spenderimmunsystems gegen Gewebe des Empfängers, der mediane Beginn liegt ungefähr

6 Monate nach der allogenen HSZT<sup>52</sup>. 50% der Patienten nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation sind betroffen<sup>53</sup> und in ca. 25% endet sie tödlich<sup>54</sup>. Ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer cGvHD wird u.a. beschrieben bei vorangegangener akuter GvHD, bei dem HLA-Mismatch zwischen Spender und Empfänger, bei peripheren Blutstammzellen als Stammzellquelle im Vergleich zum KM, bei vorhergehenden Infektionen wie CMV-Reaktivierung und bei dem fortgeschrittenen Alter des Spenders und Empfängers<sup>55-61</sup>. Die laut „National Institutes of Health“ häufig befallenen Organe sind die Haut, subkutanes Bindegewebe, die Augen, die Mundschleimhaut, die Speicheldrüsen, der Darm, die Leber, die Lunge, Faszien bzw. Muskeln und die Genitalien<sup>44</sup>, doch können geradezu alle Organe befallen sein. Das Erscheinungsbild einer chronischen GvHD ähnelt einer Autoimmunerkrankung. Im Folgenden eine Aufzählung typischer Erscheinungen: Sklerodermie - ähnliche Hautveränderungen, Weichteil- und Schleimhautveränderungen, entzündlich desquamative und fibrosierende Läsionen im GI-Trakt, cholestatische Leberveränderungen, Fasciitiden, Lungenbeteiligung in Form von Bronchiolitis obliterans, sowie ein zu opportunistischen Infektionen prädisponierendem persistierendem Immundefekt<sup>53,62</sup>. Die Einteilung des Schweregrades (mild, moderat und schwer) der cGvHD erfolgt anhand des Schweregrads der Organmanifestation und der Zahl der betroffenen Organe<sup>44</sup>.

In der Behandlung der GvHD werden sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch immunsuppressive und antiinflammatorische Medikamente eingesetzt. In den ersten Monaten nach der Transplantation wird standardmäßig eine medikamentöse Prophylaxe verabreicht, Dauer und Intensität variieren abhängig von individuellen Risikofaktoren wie HLA-Kompatibilität. Das in Deutschland prophylaktische Standardschema der GvHD ist die Kombination eines Calcineurin-Inhibitors wie Cyclosporin A oder Tacrolimus mit Methotrexat oder Mycophenolat Mofetil. Darüber hinaus gilt die Hinzunahme von Antithymozytenglobuline als eine effektive Maßnahme zur Abwendung einer akuten und chronischen GvHD bei Vorliegen eines erhöhten GvHD Risikos<sup>63</sup>.

Die Therapie richtet sich zunächst nach dem Schweregrad der GvHD und dem betroffenen Organ. In der Erstlinientherapie spielt das Prednisolon eine zentrale Rolle. Bei Nicht-Ansprechen auf Prednisolon existiert eine Vielzahl an Arzneimitteln als Zweitlinientherapie. Die Wahl des Wirkstoffs und die Reihenfolge der Verabreichung sind äußerst uneinheitlich. Die Strategien bei steroidrefraktären GvHD basieren besonders auf den eigenen klinischen Erfahrungen der Zentren<sup>64</sup>. Spezifische Therapien der betroffenen Organe, physikalische und supportive Therapien erweitern den Umfang der Behandlung.

## 2.4.2 Infektionen

### 2.4.2.1 Allgemeines

Postengraftment-Infektionen verursachen eine erhebliche Morbidität und Mortalität. Die vorausgehende Konditionierung und die damit einhergehende Phase der Aplasie einerseits, sowie die GvHD-Behandlung andererseits, erhöhen das Risiko, an opportunistischen Infektionen durch Bakterien, Viren und Pilzen zu erkranken. Insbesondere die Reaktivierung latenter Infektionen mit humanpathogenen Herpesviren wie dem CMV oder EBV stellt eine gefürchtete Komplikation nach der HSZT dar. Die Reaktivierung einer BKPyV-Infektion ist im Vergleich zu zuvor genannten Viren seltener zu beobachten, dennoch gefürchtet. Weitere Viren, die für eine Infektion der HSZT-Patienten verantwortlich sind, sind HSV, VZV, Adenoviren, HHV6 und Viren der oberen Atemwege wie Influenza, Parainfluenza und RSV<sup>65</sup>. Die Primärinfektion der Erreger verläuft in der Regel inapparent, die lebenslange Kontrolle erfordert ein funktionierendes Immunsystem. Doch im Fall einer Immunsuppression kann es zu einer Reaktivierung mit schweren klinischen Verläufen kommen. Daher erfordert die Posttransplantationsphase umfangreiche Screeningkontrollen und prophylaktische Behandlungen.

In Abhängigkeit des Zeitpunkts Posttransplantation wird mit verschiedenen Erregern gerechnet.

Phase I – direkt nach der Konditionierung – bezeichnet die Phase des Pre-Engraftment. Sie zeichnet sich durch die Neutropenie und Schrankenstörung – im Speziellen durch drastische Schleimhautschädigungen im Mundbereich und in den Darmabschnitten - aus. Bis zur Neutrophilenregeneration dominieren Infektionen mit Bakterien (grampositiv und –negativ), Pilzen (wie *Aspergillus* oder *Candida*) und Viren (insbes. HSV). Etwa 90% der Infektionen werden durch Bakterien ausgelöst<sup>66</sup>.

Phase II - Post-Engraftment - stellt durch das Auftreten der akuten GvHD und deren Therapie ein Zeitabschnitt mit beeinträchtigter zellulärer und humoraler Immunität dar. Virale Erreger, allen voran CMV, können eine große Gefahr hervorbringen. Zusätzlich lassen sich häufig *Pneumocystis jiroveci* und *Aspergillus species* nachweisen.

In der dritten Phase, der Spätphase, in der weiterhin die Immunität gestört ist und die chronische GvHD den Verlauf bestimmt, zeigen sich besonders Infektionen mit bekapselten Bakterien (z.B. *Streptococcus pneumoniae*)<sup>67</sup>.

Die Infektionsprophylaxe zielt besonders auf die Reduktion körpereigener Erreger ab und das Vermeiden einer Kolonisation mit neuen Keimen, z.B. durch Expositionsprophylaxe oder Umkehrisolation. Selektive medikamentöse Infektionsprophylaxen, deren Wirkspektrum die typischen Vertreter dieser Erreger abdeckt, finden routinemäßig Anwendung bis zur Rekonstitution des Immunsystems.

### 2.4.2.2 Cytomegalie-Virus

Das Cytomegalie-Virus (CMV) wird auch als humanes Herpesvirus Typ 5 (HHV-5) bezeichnet und gehört zur Familie der *Herpesviridae*. CMV besitzt eine lineare doppelsträngige DNA, die von einem Kapsid umgeben ist. Es kommt beim Menschen ubiquitär vor und zeigt je nach geographischer Region und sozioökonomischem Status eine 40-100%-ige Seropositivität beim Erwachsenen<sup>68</sup>. Die Infektion erfolgt zum einen von der Mutter auf das Kind diaplazentär, perinatal und über die Muttermilch<sup>69</sup>, zum anderen über Schmierinfektion, also direkten Kontakt von Schleimhäuten mit infektiösen Körperflüssigkeiten wie Nasensekret, Speichel, Tränenflüssigkeit, Urin und Genitalsekreten<sup>70</sup>. Die Transfusion infektiöser Blutprodukte<sup>71</sup> oder die Transplantation infizierter Organe<sup>72</sup> bergen das Risiko einer iatrogenen Infektion. Nach einer asymptomatischen oder subklinischen Primärinfektion persistiert das Virus dauerhaft latent im Körper. Bei Reaktivierung im immunsupprimierten Patienten kann sich die CMV-Erkrankung verschiedenartig manifestieren, unter anderem als Pneumonie, Colitis, Ösophagitis, Retinitis, Enzephalitis und Hepatitis. Zu beobachten sind mehrheitlich die atypische interstitielle Pneumonie und Manifestationen im Gastrointestinaltrakt<sup>73</sup>.

Bei der Suche eines geeigneten Spenders sollte auch der CMV-Status erhoben werden, denn die Konstellation des CMV-Serostatus von Empfänger und Spender beeinflusst die Inzidenz und den Schweregrad der klinischen Manifestation von CMV-Infektionen bzw. – Reaktivierungen<sup>74</sup>. Zur Reduktion der transplantationsassoziierten Mortalität sollte der CMV-seronegative Empfänger Stammzellen eines ebenfalls seronegativen Donors erhalten. Das Match der CMV-Konstellation gilt ebenfalls für die CMV-Seropositivität.

Als Standardtherapeutikum der CMV-Infektion stehen Ganciclovir (i.v), Valganciclovir (p.o.), Foscarnet, Cidofovir, Leflunomid und CMV-Immunglobuline (bei Pneumonie) zur Verfügung. Ganciclovir gilt als First-line Therapie<sup>75</sup>. Die Anwendung der verfügbaren Virustatika ist durch Nebenwirkungen wie Myelosuppression und Nephrotoxizität limitiert. Eine Prophylaxe mit einem Virostatikum findet Anwendung bei Patienten mit hohem CMV-Infektionsrisiko als vorbeugende Behandlung um die Entstehung einer CMV Infektion zu verhindern. Zu diesen Risikofaktoren zählen z.B. Patienten mit haploiden oder mit nicht-verwandten Mismatch-Spendern. Die Zulassung neuerer antiviraler Wirkstoffe wie Letemovir 2018 erweiterten das medikamentöse Spektrum der CMV Prophylaxe um nebenwirkungsärmere Arzneimittel<sup>76,77</sup>.

Die präemptive Therapie basiert auf dem aktiven Monitoring der CMV-Reaktivierung aus Blutproben des HSZT-Transplantierten. Beim Nachweis positiver Replikation soll die antivirale Behandlung vor der Manifestation von klinischen Symptomen genutzt werden. Sie konnte eine Verbesserung des CMV-bezogenen Outcomes zeigen und gilt daher als Standard<sup>78</sup>. Die primäre CMV-Infektion eines CMV-seronegativen Patienten mit seronegativem Donor soll durch die Transfusion lediglich seronegativer Blutprodukte oder die Verwendung von leukozytendepletierten Blutplättchenpräparaten vermieden werden<sup>79</sup>.

### 2.4.2.3 BK-Polyomavirus

Das BK-Polyomavirus (BKPyV) gehört zur Familie der *Polyomaviridae* und ist ein hüllenloses DNA-Doppelstrangvirus mit einer Prävalenz in der Gesamtbevölkerung von über 80%<sup>80</sup>. Es wurde erstmals 1971 aus dem Urin eines Nierentransplantatempfängers (B.K.) isoliert und nach diesem benannt. Die Infektion erfolgt insbesondere im Kindesalter<sup>81</sup> oral durch Schmierinfektionen mit dem Urin infizierter Personen. Nach Primärinfektion persistiert das Virus lebenslang im Urothelgewebe der Nieren und des Harntraktes als auch in den Leukozyten<sup>82,83</sup>. Bei Immunkompetenten ist die klinische Bedeutung des Virus gering, die Infektion verläuft meist asymptomatisch oder mit grippeähnlicher Symptomatik<sup>84</sup>. Schwerwiegende Symptome treten fast ausschließlich im Rahmen einer Reaktivierung unter Immunsuppression wie bei der Nieren- oder Knochenmarktransplantation auf. Besonders hervorzuheben sind die tubulointerstitielle Nephritis nach Nierentransplantation mit dem Risiko des Transplantatversagens, eine neu auftretende Uretherstenose<sup>85</sup> sowie die hämorrhagische Zystitis (*hemorrhagic cystitis*, HC) nach Stammzelltransplantation<sup>86</sup>. Bis zu 25% aller HSZT-Empfänger erkranken an der BKPyV-assoziierten hämorrhagischen Zystitis<sup>87</sup>.

Die klinischen Symptome variieren von Hämaturie, ständigen Harndrang mit Pollakisurie und Algurie bis hin zur Hydronephrose und möglicher Niereninsuffizienz<sup>88</sup>. Als Ursache für die Entstehung der HC bei BKPyV-Reaktivierung werden besonders der Spendertyp, die notwendige Immunsuppression sowie das Konditionierungsschema angesehen<sup>89</sup>.

### 2.4.2.4 Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) gehört wie das CMV zur Familie der *Herpesviridae*, deren Genom als lineare, doppelsträngige DNA vorliegt. Benannt wurde es nach seinen Entdeckern Michael Epstein und Yvonne Barr (1964). Sie isolierten das Virus aus B-Zelllinien eines afrikanischen Patienten mit Burkitt-Lymphomen und lieferten erstmals Hinweise auf die kausale Beteiligung des Virus an der Onkogenese<sup>90</sup>. Außer dem Burkitt-Lymphom ist es mit weiteren menschlichen Tumorerkrankungen assoziiert: dem Hodgkin-Lymphom<sup>91</sup> und dem Nasopharynxkarzinom<sup>92</sup>.

Die Infektion erfolgt zumeist im Kindesalter und verläuft meist asymptomatisch. Kommt es zur Infektion bei Jugendlichen oder Erwachsenen, treten gehäuft die Anzeichen einer infektiösen Mononukleose auf. Diese lymphoproliferative Erkrankung wurde nach dem Kinderarzt E. Pfeiffer beschrieben und ist bekannt als das Pfeiffersche Drüsenfieber. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass EBV mit einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen wie Immundefizienzen, Multiple Sklerose, systemischer Lupus erythematosus und evtl. auch Rheumatoiden Arthritis in Zusammenhang steht<sup>93</sup>.

Das Virus gelangt über Speichel in die B-Lymphozyten der Mund- und Rachenschleimhaut. Dies verursacht eine polyklonale Aktivierung dieser Zellen, die sich in der Schwellung der

lymphatischen Gewebe wie Milz, Lymphknoten und Tonsillen äußert. Im immunologisch gesunden Organismus regulieren natürliche Killerzellen und zytotoxische T-Zellen (*Cytotoxic T lymphocyte*, CTL) die unkontrollierte Proliferation der infizierten B-Zellen<sup>94</sup>. Die Verbreitung liegt weltweit bei einer ca. 95-%-igen Seropositivität<sup>95</sup>. Nachweislich tragen Infizierte nach der Primärinfektion lebenslang EBV-positive B-Zellen im Blut. Wie andere Herpesviren kann es zu einer Reaktivierung kommen, insbesondere bei bestehender Immunsuppression (z.B. bei HIV und Transplantatempfängern). In Organtransplantierten sowie allogenen HSZT-Empfängern zeigte sich die Entstehung von Lymphomen durch die EBV- Reaktivierung. Diese Erkrankung ist bekannt als posttransplantierte lymphoproliferative Erkrankung (*Post-Transplantat Lymphoproliferative Disorder*, PTLD). Die PTLD präsentiert sich als heterogenes Krankheitsbild mit unspezifischen Symptomen wie Fieber, Müdigkeit, Gewichtsverlust, schmerzloser Lymphknotenvergrößerung bis hin zu schnell wachsender Raumforderung im transplantierten Organ sowie in anderweitigen extranodalen Geweben (z.B. obere Luftwege, Intestinum). Daneben kann sie als diffuse, fulminant verlaufende Sepsis-ähnliche Erkrankung verlaufen<sup>96</sup>.

#### **2.4.2.5 Torque Teno Virus**

Das Torque Teno Virus (TTV) wurde 1997 erstmalig aus einem japanischen Patienten mit Posttransfusionshepatitis unbekannter Ätiologie isoliert<sup>97</sup>. Anfänglich wurde das Virus nach den Initialen des Indexpatienten als T.T. Virus benannt. Anschließend stellte der Initialname den vermuteten Übertragungsweg (*Transfusion Transmitted Virus*) dar, bis es zuletzt, angelehnt an die Genomstruktur, als Torque Teno Virus (lat. Torquere=drehen; tenuis=dünn) bezeichnet wurde<sup>98</sup>.

Es wird der Familie *Anelloviridae* und dem Genus *Anellovirus* zugeordnet. Gemäß Itoh und Kollegen zeigten Untersuchungen und elektronenmikroskopische Aufnahmen von TTV-Partikeln, die aus menschlichem Fäzes isoliert wurden, eine Partikelgröße von 30 - 32nm<sup>99</sup>. Anelloviren umfassen unbehüllte Viren mit zirkulärer ssDNA-Genom negativer Polarität. 1999 wurde nachgewiesen, dass das Prototyp-TTV-Isolat (TA278) des Genotyp 1 eine Genomgröße von 3853 nt aufweist<sup>100</sup>. TTV zeigt eine für ein DNA-Virus außergewöhnlich hohe genetische Variabilität mit einer Sequenzdivergenz zwischen den Genotypen von über 30%<sup>101</sup>. Aufgrund der genetischen Variabilität wurden die TTV-Stämme zunächst in fünf verschiedene phylogenetische Gruppen eingeteilt<sup>102</sup>. 2016 gelang es Hsiao et al. durch Sequenzanalysen aus Proben taiwanesischer Bevölkerung zwei neue phylogenetische Gruppen zu identifizieren<sup>103</sup>. Es zeigte sich, dass multiple Infektionen eines Individuums mit mehreren Genogruppen und –typen zur gleichen Zeit möglich sind<sup>104</sup>.

Die Einteilung des Genoms erfolgt in die potentiell kodierende Region von ca. 2,6 kb Länge und in eine untranslatierte Region (UTR) von 1,2 kb. Die erst angegebene umfasst zwei offene

Leserahmen (ORF1 und ORF2). Diese liegt im antigenomischen Plusstrang vor und ist fragmentarisch überlappend (vgl. Abbildung 1). Beim Urtyp TA278 liegt der ORF1 zwischen den Nukleotiden 589 und 2898 und kodiert für 770 Aminosäuren. Der zweite Leserahmen (ORF2) befindet sich zwischen den Nukleotiden 107 und 712 und kodiert für 150 Aminosäuren. Sequenzanalysen von 11 Isolaten<sup>105</sup> zeigten die Existenz eines zusätzlich offenen Leserahmens (ORF3), welcher bei TA278 zwischen Nukleotid 2904 und 3074 zu finden war. Er kodiert für 57 Aminosäuren und befindet sich stromabwärts von ORF1<sup>106-108</sup>. Es wurden weitere offene Leserahmen für verschiedene Isolate beschrieben. Das Gesamtgenom wird zu einem Drittel von der UTR-Region eingenommen und trägt einen GC-reichen Abschnitt, dessen Anteil in Abhängigkeit vom Genotyp divergiert. Ferner liegen in der UTR ein Promotor und transkriptionelle Enhancerelemente.

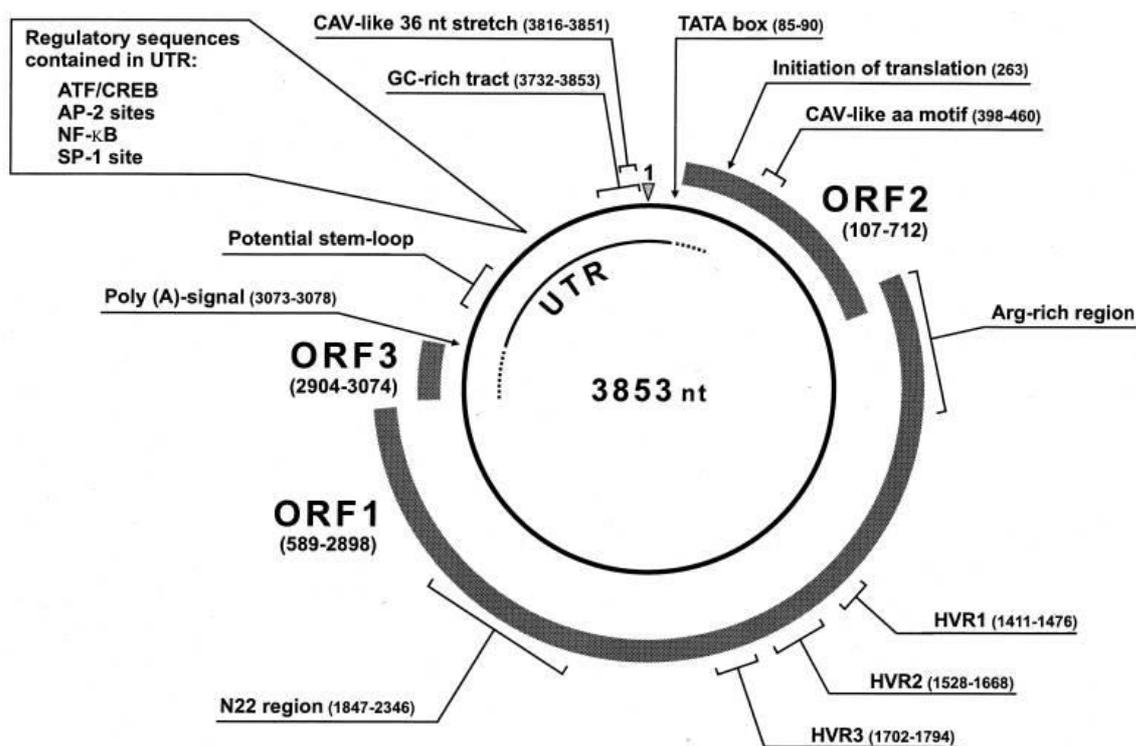


Abbildung 1: Schematische Darstellung des TTV-Genoms (Isolat TA278)<sup>107</sup>

In der gesunden Bevölkerung zeigt sich eine hohe Prävalenz von teils mehr als 90% und einer relativ gleichmäßigen Verteilung weltweit<sup>109</sup>. Bislang existiert kein direkter Hinweis auf eine Pathogenität oder den Zusammenhang zwischen Infektion und spezifischen klinischen Erkrankungen<sup>110</sup>. Der Plasma-TTV-Spiegel bei gesunden Menschen und nicht-immungeschwächten Patienten liegt zwischen  $2,3 \pm 0,7 \log_{10}$  Kopien/mL<sup>111</sup> und spiegelt das Gleichgewicht zwischen Virusreplikation und antiretroviraler Immunantwort mit einer täglichen Clearance Rate von 90% wider. Es wird angenommen, dass die zellvermittelte Immunität eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Plasmaspiegels spielt<sup>112,113</sup>.

Studien haben gezeigt, dass das TTV keine bestimmte Zellspezifität oder keinen Tropismus aufweist und die virale Genomreplikation in verschiedenen Geweben und Organen stattfindet. Replizierende TT-Viren wurden z.B. in der Leber<sup>101</sup>, in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)<sup>114,115</sup> und im Knochenmark<sup>116</sup> nachgewiesen. Der vorrangige Replikationsort der Viren wird den mononukleären Zellen des peripheren Blutes, insbesondere den T-Lymphozyten zugeschrieben<sup>117</sup>. Über den genauen Ablauf der Replikation existieren bislang nur wenige Daten. Es gibt Hinweise darauf, dass die Genomreplikation dem Rolling-circle-Mechanismus folgt<sup>100</sup>.

Nach der Entdeckung wurde angenommen, dass die Übertragung ausschließlich durch Blut und Blutprodukte stattfindet. Ein Hinweis darauf war die überproportional hohe Durchseuchung der Hämophilie- und Transplantationspatienten<sup>118,119</sup> sowie der vom Gebrauch intravenöser Drogen abhängigen Patienten<sup>120</sup>. Es wurde von einer fäkal-oralen Transmission ausgegangen<sup>121</sup>, nachdem ebenfalls der Nachweis von TTV-DNA in Leber, Galle und Fäzes erbracht wurde. Das Vorhandensein von TTV-DNA im Rachenschleim<sup>122</sup> legt eine Übertragung durch Tröpfchen- und Schmierinfektion nahe. Darüber hinaus hat die Studie von Chikasue et al. den Nachweis von TTV im Atem infizierter Personen erbracht<sup>123</sup>. Virus-DNA in Spermien<sup>124</sup> deutet auch auf sexuelle Transmission hin. Studien bewiesen, dass die Übertragung über Nabelschnurblut und Muttermilch<sup>125</sup>, durch Kontakt mit Haut oder Haaren von infizierten Personen<sup>126</sup> sowie über den transplazentären Transmissionsweg<sup>127</sup> möglich sind.

Erhöhte Replikationsniveaus wurden u.a. bei Patienten mit HIV-Infektion<sup>128</sup>, Sepsis<sup>129</sup>, rheumatoiden Arthritis<sup>130</sup>, unbehandelten soliden Tumoren<sup>131</sup> und nach Organtransplantation<sup>132,133</sup> beobachtet. Es ist aber wahrscheinlich, dass diese erhöhte Virus-DNA-Last eine Folge der Immunsuppression und nicht ursächlich ist.

Das Verständnis über die Interaktion zwischen TTV und dem Immunsystem ist wegen seiner (vermuteten) benignen Natur von besonderem Interesse und vermag zu verschiedenen Anwendungen in der Patientenversorgung genutzt werden. In den vergangenen Jahren gingen aus der Forschung einige Untersuchungen in verschiedenen Patientengruppen hervor. Madsen et al. zeigte bereits 2001, dass die TTV-Viruslast als ein Biomarker der Immunrestitution nach Beginn der HAART in HIV-positiven Patienten gelten kann<sup>134</sup>. Ähnliche Untersuchungen wurden mitunter bereits für solide Organtransplantationen von Nieren<sup>135</sup> und Lungen<sup>136</sup> und Patienten mit chronischer Arthritis<sup>137</sup> gemacht.

## **2.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Die allogene HSZT hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einer bewährten Therapiemethode zur Behandlung hämatologischer Erkrankungen entwickelt. Ziel der Transplantation von pluripotenten hämatopoetischer Stammzellen ist durch das erfolgreiche Ansiedeln im

Empfängerorganismus und die dortige Proliferation und Differenzierung die Hämatopoese zu rekonstituieren. Die vorherige Konditionierungstherapie sowie der Graft-versus-Leukämie-Effekt sollen in Summe maligne Zellen eliminieren.

Mögliche, durch die Transplantation bedingte Todesursachen sind vor allem die GvHD und die beschriebenen Infektionen. Die Mortalität nach der allogenen Stammzelltransplantation hat sich dank verbesserter Transplantationstechniken und supportiver Therapien deutlich dezimiert.

Die Prävention dieser Komplikationen erfordert sensitive und reproduzierbare Methoden zur möglichst frühzeitigen Vorhersage potentieller Schwierigkeiten. Insbesondere die Beurteilung der Immunität ist von besonderem Interesse, da Behandlungen nach der Transplantation entsprechend angeglichen werden könnten. Bislang wurde kein objektiver Parameter ermittelt, der den Grad der Immunrestitution widerspiegelt.

Das Ziel dieser vorliegenden retrospektiven Studie ist es, die Dynamik der TTV-Reaktivierung anhand der Viruslast und deren zeitlichen Verlauf bei 23 stammzelltransplantierten Patienten zu analysieren. Die Dynamik der TTV-Virämie wurde in Bezug zu anderen nicht-TTV-Reaktivierungen (CMV, EBV, BKPyV), GvHD und der Erholung der Immunzellen analysiert. Damit soll untersucht werden, ob die Überwachung der TTV-Titer bei HSZT als möglicher Parameter zur Bewertung der Immunregeneration genutzt werden kann. Somit würde die individuelle Vorhersage möglicher Komplikationen erleichtert werden, um infolgedessen die Therapie rechtzeitig optimieren zu können.

### **3 Publikation**

Reproduziert mit Genehmigung von Springer Nature

# Dynamics of Torque Teno virus viremia could predict risk of complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Ramona Gilles<sup>1</sup> · Marco Herling<sup>2</sup> · Udo Holtick<sup>2</sup> · Eva Heger<sup>1</sup> · Sabine Awerkiew<sup>1</sup> · Irina Fish<sup>1</sup> · Konstantin Höller<sup>1</sup> · Saleta Sierra<sup>1</sup> · Elena Knops<sup>1</sup> · Rolf Kaiser<sup>1</sup> · Christof Scheid<sup>2</sup> · Veronica Di Cristanziano<sup>1</sup> 

Received: 21 April 2017 / Accepted: 8 July 2017  
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

**Abstract** Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is an established treatment option for several hematological diseases. However, the first year post-transplantation is often complicated by infections and graft-versus-host disease (GVHD). Improvements in immunological monitoring could reduce such post-transplant complications. Torque Teno virus (TTV), a chronically persisting DNA virus, is reported to be a marker for immune function in immunocompromised patients. In the present study, the TTV kinetics were analyzed to investigate the potential role of TTV viremia as immune-competence read-out after allo-HSCT. Twenty-three monocentric allo-HSCT recipients were retrospectively tested for TTV-DNA in whole blood at given day post-transplant. Dynamics of TTV viremia was analyzed with respect to episodes of non-TTV viral reactivations (CMV, EBV, and BKPyV), acute GVHD, and recovery of immune cells. Recipients affected by persisting viral infections and/or GVHD during the first 100 days after allo-HSCT showed a significantly higher median TTV load at day +30 than patients with a less complicated clinical course ( $p = 0.005$ ). This was also associated with a total lymphocyte count  $<5.5E+08$  cells/L in this high-risk group ( $p = 0.039$ ). These findings suggest that TTV could represent an additional parameter to identify patients at higher risk for complications in the first 100 days following allo-HSCT. Prospective studies, including the monitoring of lymphocyte subsets, are required to

define the potential use of TTV in immunological monitoring after allo-HSCT.

**Keywords** TTV · Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation · Viral reactivation · GVHD

## Introduction

Immune recovery after allogeneic hematopoietic stem cell transplant (allo-HSCT) strongly influences the clinical outcome of recipients [1]. In general, numeric hematopoietic reconstitution occurs within the first 30 day post-transplant. However, restoration of adaptive immunity following allo-HSCT is a more protracted process, including thymus dependent and independent pathways [2]. Given the crucial role of adaptive immune response in the clearance of most viral pathogens, allo-HSCT recipients are particularly at risk for opportunistic viral infections during the first 100 days post-transplantation [3]. This particularly applies to those by CMV, EBV, or BKPyV, and includes their reactivation and mediated clinical disease [4, 5]. In addition, the process of post-HSCT immune reconstitution can also be associated with the adverse clinical manifestations of graft-versus-host disease (GVHD). Immune suppression to prevent and treat GVHD additionally promotes viral reactivations, which in turn can trigger GVHD [6, 7]. Overall, this perpetuating circle of post-allo-HSCT complications and their prevention represents a major challenge for transplant care givers.

There are intense efforts being undertaken to estimate the functional impairment of T-cell-mediated immunity following allo-HSCT, as this would allow the identification of patients at higher risk for opportunistic infections, and consequently also facilitate improvements

✉ Veronica Di Cristanziano  
veronica.di-cristanziano@uk-koeln.de

<sup>1</sup> Institute of Virology, University of Cologne, Cologne, Germany

<sup>2</sup> Department I of Internal Medicine, University Hospital of Cologne, Cologne, Germany

in the management of patients affected by GVHD. The identification of markers as easy-to-use readouts that mirror in a clinical relevant way the functional recovery of the immune system post-allo-HSCT could help clinicians to adapt diagnostics tools and therapeutic strategies in a more individualized fashion.

A potential candidate to determine the functionality of the recovering of immune system is the Torque Teno virus (TTV). TTV is a small, non-enveloped, single-stranded DNA virus that was first isolated from a patient with hepatitis of unknown aetiology in Japan [8]. TTV is highly prevalent in humans and a low-level viremia is detectable in up to 90% of healthy carriers [9]. So far, no clear association of TTV with a specific human disease has been found. However, TTV replication was reported to reflect the impairment of the immune system in transplant recipients and patients infected with HIV [10, 11]. The aim of this study was to analyze the dynamics of TTV viremia after allo-HSCT to identify a possible association between TTV replication profiles and the clinical course post-transplant, including non-TTV viral reactivations and GVHD.

## Materials and methods

### Patients

This retrospective study included 23 allo-HSCT recipients treated in the stem cell transplantation program at the Department of Internal Medicine I of the University Hospital of Cologne. The patients (10 females and 13 males) were aged between 33 and 75 years (median 57 years). Patient and donor characteristics are detailed in Table 1.

The patients underwent allo-HSCT between November 2014 and April 2015. Cyclosporin A (CSA) in combination with methotrexate (MTX) or with mycophenolate mofetil (MMF) was used as GVHD prophylaxis in all patients. MMF was tapered until day +50 in the absence of GVHD. CSA was tapered from day +100. First-line treatment of acute GVHD III–IV° was prednisolone at a dose of 2 mg/kg/day.

The dynamics of TTV viremia was correlated with the characteristics of episodes of other viral infections, including CMV, EBV, and BKPyV reactivations, as well as to the onset of acute GVHD occurring within the first 100 days after allo-HSCT. Episodes of GVHD not requiring systemic therapy were not considered.

Leucocyte, lymphocyte, and neutrophil counts in peripheral blood post-transplantation were also analyzed.

### TTV-DNA extraction and quantification by real-time PCR

Whole blood samples collected during the follow-up at days +30, +100, and +200 post-transplantation were retrospectively tested by real-time PCR for TTV-DNA.

Each whole blood sample was diluted 1:1 with Predilution-Buffer (Siemens Healthcare Diagnostics). Viral DNA was extracted from 700 µl of sample preparation using the automated platform VERSANT kPCR Molecular System with MiPLX software solution and the VERSANT Sample Preparation 1.2 Reagents Kit (Siemens Healthcare Diagnostics) into an elution volume of 100 µl, according to manufacturer's instructions.

TTV primers and probes for real-time PCR were provided from the Department of Virology of Medical University of Vienna [11, 12]. The real-time PCR was performed using VERSANT kPCR Molecular System (Siemens Healthcare Diagnostics) at the following conditions: 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles at 95 °C for 15 s, and 58 °C for 60 s.

Sixteen healthy individuals (no immunosuppression) were also tested for TTV viremia, as described above.

### CMV-, EBV-, BKPyV-DNA extraction and quantification by real-time PCR

CMV and EBV viral load was tested at least once, usually twice a week, from day 0 until day +200. Respective whole blood samples were extracted as described above and analyzed by real-time PCR in an automated and multiplexed setup on the VERSANT kPCR Molecular System with MIPLX Software Solution (Siemens Healthcare Diagnostics). For BKPyV, allo-HSCT recipients were tested at least once a week in urine and/or plasma until day +30 after allo-HSCT. Following hospital discharge, urine and/or plasma samples were tested for BKPyV only if clinically indicated, e.g. after history of HC or upon new symptoms. Viral DNA was extracted from 700 µL of urine and/or plasma samples using the automated platform VERSANT kPCR Molecular System and the VERSANT Sample Preparation 1.0 Reagents Kit (Siemens Healthcare Diagnostics) into an elution volume of 100 µL, according to the manufacturer's instructions. BKPyV load was determined by RealStar® BKV PCR Kit 1.0 (Altona Diagnostics GmbH), using the LightCycler 480 (Roche Diagnostic GmbH), according to the manufacturer's protocol.

### Statistics

TTV viral loads and leucocyte subset counts of low- and high-risk patient groups were compared using the Mann–Whitney *U* test and the Fisher's exact test. Statistical

**Table 1** Clinical data of the 23 allo-HSCT recipients and their donors

Pat. ID	Group assignment	Underlying disease	CMV IgG R	CMV IgG D	Donor type	Conditioning regimen	GVHD prophylaxe	Time to end of neutropenia <sup>a</sup>
P1	Low risk	MDS-RAEB	+	+	MMUD	FLU/BU/ATG	CSA/MMF	16
P2	Low risk	AML	+	+	MUD	FLAMSA/TBI/ATG	CSA/MMF	20
P3	Low risk	AML	+	+	MUD	FLU/BU	CSA/MTX	18
P4	Low risk	ALL	+	+	MMUD	FLAMSA/TBI/ATG	CSA/MMF	21
P5	Low risk	AITL	–	–	MRD	FLU/BU	CSA/MMF	17
P6	Low risk	HSTCL	–	–	MUD	FLU/BU/CY	ATG/CSA	21
P7	Low risk	PMF	–	+	MMUD	FLU/BU/ATG	CSA/TAC	25
P8	Low risk	MM	–	+	MUD	FLU/BU	CSA/MMF	17
P9	Low risk	AML	–	+	MMUD	FLAMSA/TREO/ATG	CSA/MMF	17
P10	Low risk	AML	+	+	MMUD	FBM/ATG	CSA/MMF	13
P11	Low risk	AML	+	+	MMUD	BU/CY/ATG	CSA/MMF	12
P12	Low risk	AML	+	+	MRD	FLU/BU	CSA/MTX	21
P13	High risk	AML	+	–	MMUD	FLU/BU/ATG	CSA/MMF	17
P14	High risk	DLBCL	+	+	MMUD	TLI/ATG	CSA/MMF	17
P15	High risk	CLL	+	+	HAPLO	FLU/BU/CY	CSA/MMF	17
P16	High risk	AML	–	–	MUD	FLAMSA/TBI/ATG	CSA/MMF	17
P17	High risk	AML	–	–	MRD	BU/CY	CSA/MMF	14
P18	High risk	T-PLL	–	–	MUD	TBI/FLU/ATG	CSA/MMF	17
P19	High risk	AML	–	+	MUD	FLAMSA/TBI/ATG	CSA/MMF	16
P20	High risk	PTCL-NOS	+	–	MRD	FLU/BU	CSA/MMF	41
P21	High risk	SMCD AML	+	–	MMUD	FLAMSA/TBI	CSA/MMF	14
P22	High risk	FL	+	–	MUD	TBI/FLU/RITUXI-MAB/ATG	MMF/TAC	28
P23	High risk	CMML	+	+	MRD	FLU/BU	CSA/MMF	16

*AITL* angioimmunoblastic T-cell lymphoma, *ALL* acute lymphoblastic leukemia, *AML* acute myeloid leukemia, *ATG* anti-thymocyte globulin, *BU* busulfan, *CMML* chronic myelomonocytic leukemia, *CLL* chronic lymphocytic leukemia, *CSA* ciclosporin, *CY* cyclophosphamide, *D* donor, *DLBCL* diffuse large B-cell lymphoma, *FBM* fludarabine, carmustine (BCNU), melphalan, *FL* follicular lymphoma, *FLAMSA* fludarabine, cytarabine, amsacrine, *FLU* fludarabine, *GVHD* graft-versus-host disease, *HAPLO* haploidentical stem cell transplantation, *HSTCL* hepatosplenic T-cell lymphoma, *MDF-RAEB* myelodysplastic syndrome-refractory anemia with excess of blasts, *MM* multiple myeloma, *MMF* mycophenolate mofetil, *MMUD* mismatched unrelated donor, *MRD* matched-related donor, *MTX* methotrexate, *MUD* matched unrelated donor, *PMF* primary myelofibrosis, *PTCL-NOS* peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified, *R* recipient, *SMCD* systemic mast cell disease, *TAC* tacrolimus, *TBI* total body irradiation, *T-PLL* T-cell prolymphocytic leukemia, *TLI* total lymphoid irradiation, *TREO* treosulfan

<sup>a</sup> Time is expressed in days after allo-HSCT

significance was defined as a two-tailed *p* value <0.05. Calculation and statistical analysis were carried out with the IBM SPSS Statistics 23.0 software.

## Results

### Classification of patients based on incidence of acute GVHD and viral reactivations

The largest proportion out of the 23 patients underwent allo-HSCT for acute myeloid leukemia (Table 1). In 15 patients, there was a concordant CMV serostatus with the

donor (D+/R+ or D–/R–), as opposed to eight recipients with a discordant constellation (D–/R+ or D+/R–).

Five patients received the graft from a matched-related donor (MRD), 8 from a matched-unrelated donor (MUD), 9 from a 1-antigen-mismatched-unrelated donor (MMUD), and one patient underwent haploidentical allo-HSCT.

Thirteen patients received anti-thymocyte globulin (ATG) in the peri-transplant period.

The end of neutropenia (>0.5 × 10<sup>9</sup>/L) was reached with a median of 17 days after allo-HSCT.

Based on the incidence of the major clinical complications, namely, GVHD or/and viral reactivations occurring within the first 100 days after allo-HSCT, the 23 patients were classified into 2 clinical risk groups. The low-risk

group consisted of 12 patients who did not develop any form of acute GVHD that would have required therapeutic intervention. Furthermore, these patients showed either limited or no CMV, EBV, or/and BKPyV reactivation. Limited CMV or/and EBV infections were defined by the asymptomatic detection of CMV-/EBV-DNA for  $\leq 2$  consecutive weeks. Limited BKPyV reactivation was defined by proof of viral DNA in urine only and absence of specific clinical symptoms [13].

The high-risk group included 11 recipients who developed acute GVHD requiring escalation of immunosuppression and/or persisting/symptomatic non-TTV viral infections. For CMV and/or EBV reactivation, this was defined by the detection of CMV- and/or EBV-DNA for  $>2$  consecutive weeks. For BKPyV, this was defined by evidence of viral replication in urine and plasma and/or by BKV-associated hemorrhagic cystitis (BKPyV-associated HC).

Overviews of patient characteristics and risk group assignment are given in Tables 1 and 2.

### Dynamics of TTV-DNA load and post-transplant clinical course in the patient risk groups

Within the low-risk group, five patients did not show any viral reactivation at all, while in another four patients, CMV reactivation was detected, of which in two cases, this was associated with EBV or BKPyV reactivation. Two additional patients displayed EBV reactivation only, whereas in one case, EBV-DNA detection was preceded by detection of BKPyV (Table 2). In addition, none of the patients of the low-risk group were affected by acute GVHD. On day +30, the low-risk group showed a median TTV-DNA load of  $2.5E+06$  copies/mL (range 0 to  $4.9E+08$  copies/mL). In more detail, four patients were detected TTV negative, whereas seven out of eight TTV positive patients of this group showed a TTV-DNA load  $<3.0E+08$  copies/mL. On day +100, TTV-DNA became detectable in all low-risk group patients, and except for 2 patients, it increased to a median viral load of  $3.0E+09$  copies/mL (range  $2.1E+06$  to  $4.6E+10$  copies/mL) at this timepoint (Fig. 1). By day +200, all patients of the low-risk group were detected to be positive for TTV at a median load of  $1.4E+07$  copies/mL (range  $2.7E+03$  to  $4.3E+09$  copies/mL) (Fig. 1).

Five out of 15 healthy individuals were detected to be TTV-DNA positive, showing a median viral load of  $1.2E+05$  copies/mL (range  $2.4E+04$  to  $1.0E+06$  copies/mL).

Within the high-risk group, two patients showed a persistent CMV infection, while four additional patients were detected BKPyV positive in urine and plasma paralleled by BKPyV-associated HC. In another patient (tested for BKPyV in urine but not in plasma), the diagnosis of BKPyV-associated HC was also confirmed. Two other

patients showed persisting EBV infection and one of them was treated with rituximab to control EBV replication.

All defined relevant viral reactivations started within the first 30 day post-transplant (Table 2). Furthermore, in 6 out of 11 patients, a muco-cutaneous, hepatic, and/or gastrointestinal GVHD was diagnosed that mandated intensification of pharmacologic immunosuppression. These patients developed GVHD between day +30 and +100, and in those who were also detected to be CMV-, BKPyV-, and/or EBV-DNA positive, the onset of GVHD was always preceded by viral reactivation.

As opposed to the low-risk group, all patients of the high-risk group were detected to be TTV-DNA positive in blood already on day +30, with a median viral load of  $1.8E+09$  copies/mL (range  $3.2E+05$  to  $7.18E+11$  copies/mL), which was significantly higher than the median viral load of the low-risk group ( $p = 0.005$ ). Different from the low-risk group, 8/11 patients of the high-risk group displayed at this time a TTV load  $>3.0E+08$  copies/mL ( $p = 0.002$ ). On day +100, except for three patients, who showed a reduced or a stable viral load, TTV viremia increased in the high-risk group, reaching a median of  $1.4E+10$  copies/mL (range  $1.0E+07$  to  $1.87E+12$  copies/mL). On day +200, all patients of the high-risk group were detected to be positive for TTV, showing a median viral load of  $2.5E+07$  copies/mL (range  $3.6E+04$  to  $9.1E+10$  copies/mL) (Fig. 1).

With respect to group-specific compositions of leucocyte subsets, patients of the low-risk group showed median values higher than patients of the high-risk group, despite a similar trend in both groups (Fig. 2). On day +30, 9 out of 12 patients of the low-risk group showed a lymphocyte count  $>5.5E+08$  cells/L, whereas 8 out of 11 patients of the high-risk group displayed a number of lymphocytes  $<5.5E+08$  cells/L ( $p = 0.039$ ) (Fig. 3).

## Discussion

Allo-HSCT is a potentially curative treatment option for malignant and non-malignant hematological diseases. Infections and GVHD represent its major causes of mortality and morbidity [14]. The immunosuppressive prophylaxis and therapy of GVHD are known risk factors for infectious complications due to their profound impact on immune recovery [15]. Considering the central role of the T-cell response in the control of viral infections as well as in the development of GVHD, the identification of an easy-to-use parameter that reflects the process of immune reconstitution would be an invaluable aid for driving therapeutic decisions in GVHD and infectious complications of allo-HSCT recipients.

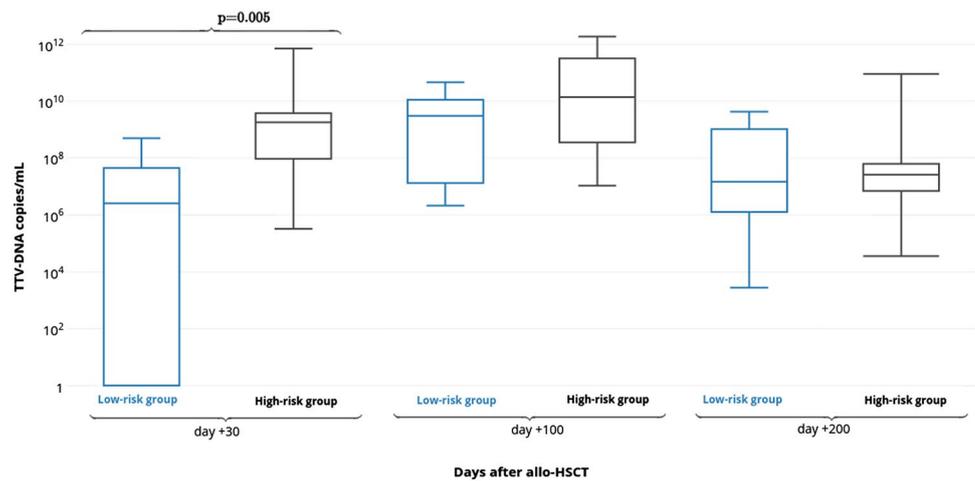
**Table 2** Characteristics of 23 allo-HSCT recipients with respect to episodes of viral reactivations and onset of GVHD within the first 100 days post-transplant

Pat. ID	Group assign-ment	CMV viremia		BKV viremia		BKV viremia		BKV viremia		EBV viremia		GVHD (time to diagnosis)		
		Time to 1st pos PCR	Viral load peak (IU/mL)	Time to 1st pos PCR	Viral load peak (copies/mL)	Time to 1st pos PCR	Viral load peak (copies/mL)	Time to 1st pos PCR	Viral load peak (copies/mL)	Time to 1st pos PCR	Viral load peak (IU/mL)	Muco-cutaneous	Hepatic	GI
P1	Low risk	14	890	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	-	-	-
P2	Low risk	35	54	35	1.0E+08	-	neg	-	neg	-	neg	-	-	-
P3	Low risk	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	-	-	-
P4	Low risk	-	neg	-	neg	-	neg	71	324	-	neg	-	-	-
P5	Low risk	-	neg	26	1.0E+08	-	neg	38	830	-	neg	-	-	-
P6	Low risk	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	-	-	-
P7	Low risk	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	-	-	-
P8	Low risk	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	80	5340	-	-	-
P9	Low risk	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	-	-	-
P10	Low risk	35	26,800	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	-	-	-
P11	Low risk	11	1050	-	neg	-	neg	14	499	-	499	-	-	-
P12	Low risk	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	-	-	-
P13	High risk	3	<b>9120<sup>a</sup></b>	3	1.0E+08	-	neg	-	neg	-	neg	-	-	-
P14	High risk	7	73,700	18	<b>1.0E+08</b>	42	<b>148</b>	-	<b>148</b>	-	neg	-	-	-
P15	High risk	13	661	18	<b>1.0E+08</b>	52	<b>107</b>	-	<b>107</b>	-	neg	48	-	-
P16	High risk	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	32	4980	-	-	32
P17	High risk	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	30	-	30
P18	High risk	-	neg	4	<b>1.0E+08</b>	10	<b>497</b>	60	<b>2620</b>	-	<b>2620</b>	-	-	-
P19	High risk	50	2870	30	<b>1.0E+08</b>	37	<b>166</b>	50	328	-	328	-	-	61
P20	High risk	21	14,100	-	neg	-	neg	-	neg	-	<b>4410</b>	-	-	-
P21	High risk	27	<b>16,700</b>	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	-	-	-
P22	High risk	13	5790	30	<b>1.0E+08</b>	Not tested	-	-	-	-	neg	100	-	-
P23	High risk	44	5590	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	93	83	-

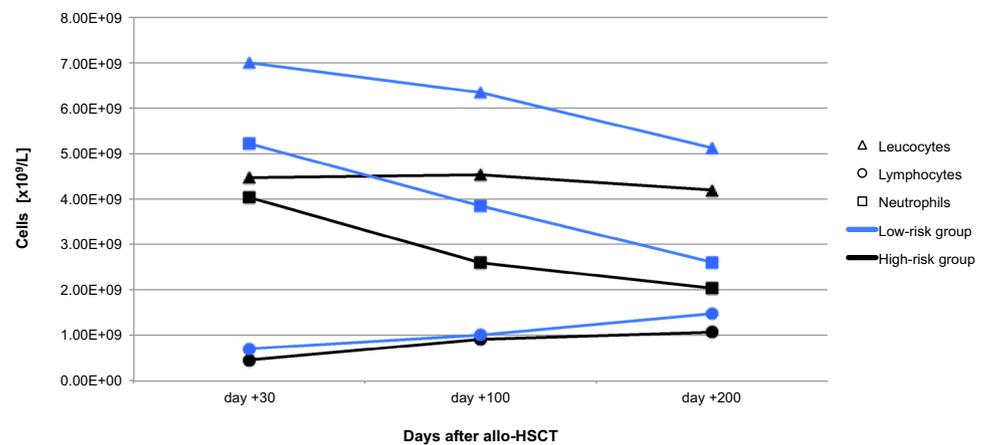
Time is expressed in days after allo-HSCT; Persisting/symptomatic non-TTV viral infections are marked in bold; GI gastrointestinal

<sup>a</sup> Ganciclovir resistance mutation in UL 97 gene

**Fig. 1** Dynamics of TTV-DNA load on days +30, +100, and +200 after allo-HSCT in the low- and high-risk group (color figure online)



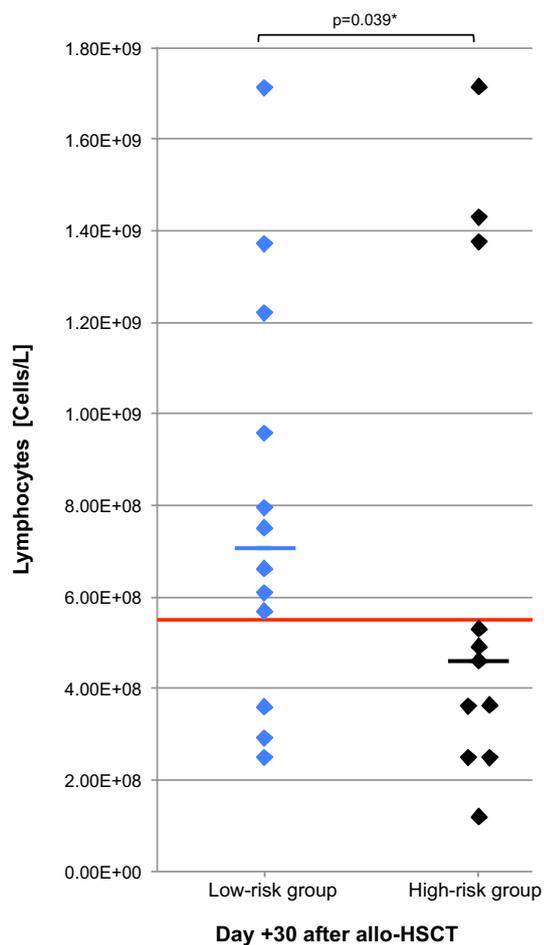
**Fig. 2** Leucocyte, lymphocyte, and neutrophil counts on days +30, +100, and +200 after allo-HSCT in the low- and high-risk group (median values) (color figure online)



This study confirmed previous observations that described higher TTV levels in immunocompromised patients compared to immunocompetent controls [10, 11, 16, 17]. In fact, TTV load has been proposed as an indirect marker of functional immune-competence and a potential means to monitor the extent of immunosuppression after solid transplantation and autologous HSCT [18, 19]. Previous studies with lung transplantation recipients showed that the incidence and extent of TTV viremia strongly increased in all patients during the first 3 months post-transplantation, positively correlating with the intensity of immunosuppression [11, 19]. Until now, only few data sets on the profile of TTV viremia in the setting of HSCT have become available. For autologous HSCT, Focosi et al. reported that the time needed for TTV viremia to return to baseline levels after the peak on day +100 post-transplant can predict the time for recovery of immune-competence [18]. The present study showed that patients who did not develop GVHD or those who developed only limited or no CMV, EBV, and BKPyV reactivations (low-risk group) revealed different kinetics in TTV viremia and leucocyte subsets. Therein, they stood in contrast to patients who developed GVHD

and/or persisting non-TTV viral reactivations within the first 100 days post-allo-HSCT (high-risk group). On day +30, the low-risk group showed a TTV-DNA load significantly lower than the high-risk group. In particular, the detection of a TTV-DNA load at this time of <3.0E+08 copies/mL combined with a lymphocyte count >5.5E+08 cells/L positively correlated with a low incidence of post-transplant complications, and in case of non-TTV viral reactivation, the infection could be rapidly controlled (persistence of viral DNA in blood for less than 2 weeks).

Our data implicate that the lower TTV viral load detected in the low-risk group compared to the high-risk group reflects a higher capacity of the immune system to control viral replication, as confirmed by the lower incidence and severity of CMV, EBV, and BKPyV reactivations. In turn, the lower occurrence of viral infections could explain at least in part the lower frequency of acute GVHDs, considering the triggering effect of an inflammatory reaction to infections in the initial phase of a GVHD [6, 15]. Between day +30 and +100, TTV viremia increased in both low- and high-risk patients. Although on day +100, the difference in TTV viral load between both groups became less



**Fig. 3** Lymphocyte counts on day +30 after allo-HSCT in the low- and high-risk group. Asterisk the statistical significance refers to the patient distribution with respect to the value of  $5.5E+08$  lymphocytes/L (red line) in the low-risk group versus the high-risk group (color figure online)

prominent, the high-risk patients still showed higher TTV titers compared to the low-risk patients. In both groups, the increment of TTV viremia between day +30 and +100 was associated with a concurrent normalization of lymphocyte counts. HSCs have been implicated as the main source of TTV replication in allo-HSCT. In fact, by analyzing plasma TTV levels in four allo-HSCT recipients, Maggi and colleagues showed a steady decline of TTV during the post-conditioning myelosuppression [20]. Starting from day +26, they also observed an increase of TTV loads paralleling the reappearance of leucocytes in peripheral blood. In a subsequent study in solid organ transplant recipients, the same research group suggested that TTV is also lymphotropic [21]. Based on our data, the possibility that both the types of cells (HSCs and peripheral lymphocytes) are involved in the maintenance of TTV viremia after allo-HSCT seems to be the most enticing. Moreover, in our

series, from day +100 onwards, TTV decreased in both risk groups, reaching comparable values on day +200. This finding may suggest that at this timepoint, the immune system of most allo-HSCT recipients accomplished sufficient capacity to control TTV replication or that the extent of viral replication in the HSC compartment decreased after the peaked repopulation during engraftment.

Taken together, the present data indicate an association between early post-allo-HSCT TTV viral load and the incidence of major transplant complications, namely, non-TTV viral reactivations and GVHD. In fact, the detection of a TTV-DNA load in blood  $<3.0E+08$  copies/mL on day +30 potentially carries predictive information for CMV/EBV/BKPyV reactivations, in terms of incidence and severity, and for GVHD during the first 100 days post-transplant.

Given the lack of systematic analyses on TTV in allo-HSCT recipients, this study was intended to present the first promising data of a small retrospective pilot. Naturally, it has some limitations, in particular, the small number of patients and its retrospective design. Due to the small cohort size, multifactorial correlations could not be performed. The retrospective nature imposed restrictions on the completeness of documented data, e.g., lymphocyte subpopulations. Therefore, a prospective survey, including a larger number of patients with longer follow-up and more parameters, will help to better address the usefulness and issues related to the application of TTV-DNA as part of the immunological monitoring after allo-HSCT.

**Acknowledgements** We thank Dr. Elisabeth Puchhammer-Stöckl and Dr. Irene Görzer (Department of Virology, Medical University of Vienna) for their support in the establishment of an in-house quantitative TTV real-time PCR assay.

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Funding** None.

#### References

1. Lucarelli B, Merli P, Bertaina V, Locatelli F (2016) Strategies to accelerate immune recovery after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Rev Clin Immunol* 12(3):343–358
2. Cíaurriz M, Zabalza A, Beloki L, Mansilla C, Pérez-Valderama E, Lachén M, Bandrés E, Olavarría E, Ramírez N (2015) The immune response to cytomegalovirus in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Cell Mol Life Sci* 72(21):4049–4062
3. Hill JA, Mayer BT, Xie H, Leisenring WM, Huang ML, Stevens-Ayers T, Milano F, Delaney C, Sorror ML, Sandmaier BM, Nichols G, Zerr DM, Jerome KR, Schiffer JT, Boeckh M (2017) The cumulative burden of double-stranded DNA virus detection

- after allogeneic HCT is associated with increased mortality. *Blood* 129(16):2316–2325
4. Ljungman P (2010) Molecular monitoring of viral infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol* 91(4):596–601
  5. Gilis L, Morisset S, Billaud G, Ducastelle-Lepretre S, Labusiere-Wallet H, Nicolini FE, Barraco F, Detrait M, Thomas X, Tedone N, Sobh M, Chidiac C, Ferry T, Salles G, Michallet M, Ader F, Lyon BK virus Study group (2014) High burden of BK virus-associated hemorrhagic cystitis in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 49(5):664–670
  6. Cantoni N, Hirsch HH, Khanna N, Gerull S, Buser A, Bucher C, Halter J, Heim D, Tichelli A, Gratwohl A, Stern M (2010) Evidence for a bidirectional relationship between cytomegalovirus replication and acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 16(9):1309–1314
  7. Miller W, Flynn P, McCullough J, Balfour HH Jr, Goldman A, Haake R, McGlave P, Ramsay N, Kersey J (1986) Cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation: an association with acute graft-v-host disease. *Blood* 67(4):1162–1167
  8. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M (1997) A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 241(1):92–97
  9. Haloschan M, Bettesch R, Görzer I, Weseslindtner L, Kundi M, Puchhammer-Stöckl E (2014) TTV DNA plasma load and its association with age, gender, and HCMV IgG serostatus in healthy adults. *Age (Dordr)* 36(5):9716
  10. Shibayama T, Masuda G, Ajisawa A, Takahashi M, Nishizawa T, Tsuda F, Okamoto H (2001) Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. *AIDS* 15(5):563–570
  11. Görzer I, Haloschan M, Jaksch P, Klepetko W, Puchhammer-Stöckl E (2014) Plasma DNA levels of Torque teno virus and immunosuppression after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 33(3):320–323
  12. Maggi F, Pifferi M, Fornai C, Andreoli E, Tempestini E, Vatteroni M, Presciuttini S, Marchi S, Pietrobelli A, Boner A, Pistello M, Bendinelli M (2003) TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. *J Virol* 77(4):2418–2425
  13. Höller K, Fabeni L, Herling M, Holtick U, Scheid C, Knops E, Lübke N, Kaiser R, Pfister H, Di Cristanziano V (2017) Dynamics of BKPyV reactivation and risk of hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol*. doi:10.1111/ejh.12895
  14. Arnaout K, Patel N, Jain M, El-Amm J, Amro F, Tabbara IA (2014) Complications of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Invest* 32(7):349–362
  15. Miller HK, Braun TM, Stillwell T, Harris AC, Choi S, Connelly J, Couriel D, Goldstein S, Kitko CL, Magenau J, Pawarode A, Reddy P, Riwes M, Yanik GA, Levine JE (2017) Infectious risk following allogeneic hematopoietic cell transplant complicated by acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 23(3):522–528
  16. Burra P, Masier A, Boldrin C, Calistri A, Andreoli E, Senzolo M, Zorzi M, Sgarabotto D, Guido M, Cillo U, Canova D, Bendinelli M, Pistello M, Maggi F, Palù G (2008) Torque Teno virus: any pathological role in liver transplanted patients? *Transpl Int* 21(10):972–979
  17. Moen EM, Sagedal S, Bjørø K, Degré M, Opstad PK, Grinde B (2003) Effect of immune modulation on TT virus (TTV) and TTV-like-mini-virus (TLMV) viremia. *J Med Virol* 70(1):177–182
  18. Focosi D, Maggi F, Albani M, Macera L, Ricci V, Gragnani S, Di Beo S, Ghimenti M, Antonelli G, Bendinelli M, Pistello M, Ceccherini-Nelli L, Petrini M (2010) Torquetenovirus viremia kinetics after autologous stem cell transplantation are predictable and may serve as a surrogate marker of functional immune reconstitution. *J Clin Virol* 47(2):189–192
  19. Görzer I, Jaksch P, Kundi M, Seitz T, Klepetko W, Puchhammer-Stöckl E (2015) Pre-transplant plasma Torque Teno virus load and increase dynamics after lung transplantation. *PLoS One* 10(3):e0122975
  20. Maggi F, Focosi D, Albani M, Lanini L, Vatteroni ML, Petrini M, Ceccherini-Nelli L, Pistello M, Bendinelli M (2010) Role of hematopoietic cells in the maintenance of chronic human Torque Teno virus plasma viremia. *J Virol* 84(13):6891–6893
  21. Focosi D, Macera L, Boggi U, Nelli LC, Maggi F (2015) Short-term kinetics of torque teno virus viraemia after induction immunosuppression confirm T lymphocytes as the main replication-competent cells. *J Gen Virol* 96(Pt 1):115–117

## 4 Diskussion

### 4.1 Zur klinischen Gegebenheit

Die allogene Stammzelltransplantation gilt als eine etablierte Behandlungsoption bei hämatologischen Erkrankungen. Fortschritte der Prävention und Behandlung während des letzten Jahrzehnts führten zu einem verbesserten Outcome dieser Patienten mit einer höheren Überlebenschance. Trotz alledem bleibt diese Therapieoption mit multiplen Komplikationen assoziiert.

Das Risiko und die Art der Komplikationen stehen in Abhängigkeit von einer Vielzahl verschiedener Faktoren, u.a. die Vorbereitungsmaßnahmen vor der Transplantation<sup>138</sup>, das Alter des Patienten<sup>139</sup>, gegenwärtige Komorbiditäten und einige weitere prognostische Parameter<sup>140-142</sup>. Die Hauptursachen für die Mortalität und Morbidität sind Infektionen und GvHD<sup>143</sup>. Das Konditionierungsschema vor der Transplantation, die immunsuppressiven Therapien nach der HSZT und die Therapie der GvHD führen zu quantitativen und qualitativen Anomalien im Immunsystem der HSZT-Empfänger, die zu einem schweren und oft langanhaltenden Immundefekt führen können<sup>144</sup>. Das zeitweise Unterdrücken des körpereigenen Immunsystems führt zum vorübergehenden Verlust der T-Zell-Immunität gegenüber verschiedenen Virusinfektionen. Angesichts dieser zentralen Rolle der T-Zell-Reaktion bei der Kontrolle von Virusinfektionen sowie bei der Entwicklung von GvHD könnte die Identifizierung eines einfach zu verwendenden Parameters von entscheidender Bedeutung sein. Dieser Parameter soll den Prozess der Immunrekonstitution widerspiegeln. Schwere klinische Verläufe ließen sich damit vorhersagen. Dieser Indikator wäre ein bedeutendes Hilfsmittel um prophylaktische und therapeutische Interventionen bei GvHD und infektiösen Komplikationen der allo-HSZT Empfänger zu steuern. Die Immunkompetenz gilt bislang als schwer zu quantifizieren und die Überwachung des Immunsystems variiert stark zwischen den behandelnden Zentren<sup>145</sup>. Häufig wird die Anzahl der T-Zellen als Biomarker der Immunrekonstitution verwendet. Das kann jedoch ungenau sein, da sich T-Zellen ohne Wiederherstellung der Immunität normalisieren können<sup>146</sup>. Die Messung der Immunität gegen ein ubiquitäres, nicht-pathogenes Virus, wie es das Torque Teno Virus ist, könnte eine effiziente Strategie zur funktionellen Bewertung der Immunrekonstitution nach allo-HSZT sein. Bisherige Studien konnten nachweisen, dass die TTV-Viruslast in immunsupprimierten Patienten wie HIV-infizierten<sup>147</sup> und Organtransplantierten<sup>112,113,148</sup> deutlich die der Immunkompetenten übersteigt. Aus diesem Grund wurde die Quantifizierung von TTV-Titern als indirekter Marker zur Messung der funktionellen Immunkompetenz und ein potentielles Mittel zur Überwachung des Ausmaßes der Immunsuppression nach Organtransplantation und autologer HSZT vorgeschlagen<sup>132,149</sup>.

Die Inzidenz und das Ausmaß der TTV-Virämie bei Organtransplantierten zeigte eine deutliche Zunahme in den ersten 3 Monaten mit Spitzenwerten zwischen dem dritten und zwölften

Monat nach Transplantation, positiv korrelierend mit der Intensität der Immunsuppression<sup>132,150</sup>. Die Kontrolle der TTV-Proliferation und der damit verbundenen Höhe der Viruslast wird der medikamenteninduzierten reduzierten Fähigkeit der T-Zellen zugeschrieben<sup>151</sup>.

Bis heute existiert nur eine geringe Datenlage über die Dynamik der TTV-Virämie im Rahmen der HSZT. Studien zur TTV-Dynamik nach der autologen HSZT postulieren, dass die Immunkompetenz an dem Zeitpunkt wiederhergestellt sei, an dem die TTV-Virämie nach dem Peak (ca. Tag +100) wieder die Ausgangswerte erreicht habe<sup>149</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurde retrospektiv in einer unizentrischen Kohorte allogener HSZT-Empfänger die Kinetik von TTV-Titern untersucht und die Beziehung zu klinischen Parametern und Rekonstitution nach Transplantation bewertet. Darüber hinaus wurde die potentielle Assoziation des TTV-Titers mit den klinischen Ergebnissen und den Komplikationen analysiert.

## **4.2 Dynamik der Virus-Reaktivierung**

Zahlreiche Studien aus der Organtransplantation über die Dynamik der TTV-Reaktivierung haben vielversprechende Daten geliefert. Nachweislich korreliert der TTV-Titer mit der Stärke der Immunsuppression<sup>152</sup> und Infektionen<sup>148</sup>. Transplantatabstoßungen ließen sich zusätzlich anhand der TTV-Titer vorhersagen<sup>152-154</sup>. Aufgrund der Heterogenität der Patienten und der Behandlungsmodalitäten ist von komplexeren Bedingungen nach der allo-HSZT auszugehen. In dieser Arbeit wurden weitere subklinische Marker erfasst und in die Auswertung einbezogen. Die 23 eingeschlossenen allo-HSZT Patienten wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Die Gruppenzuordnung erfolgte anhand des Risikos zur Entwicklung von Komplikationen nach der allogenen HSZT.

Beurteilt wurde die Dynamik der TTV-Virämie korrelierend mit den Merkmalen von Episoden anderer Virusinfektionen, einschließlich CMV-, EBV- und BKPyV-Reaktivierungen. Darüber hinaus wurde das Einsetzen von akuter GvHD, das innerhalb der ersten 100 Tage nach allo-HSZT auftrat in die Analyse integriert.

Im Speziellen definierte sich die Gruppe des niedrigen Risikos durch folgende Faktoren: die Abwesenheit einer akuten GvHD, die asymptomatische Detektion der CMV- oder EBV-DNA für weniger als 2 aufeinanderfolgende Wochen, die limitierte BKPyV-Reaktivierung durch den positiven Nachweis ausschließlich im Urin und die Abwesenheit spezifischer klinischer Symptome.

Im Umkehrschluss schließt die Gruppe des hohen Risikos Patienten mit akuter GvHD ein, die eine Eskalation der Immunsuppression erforderte. Weitere Einschlusskriterien sind die Detektion von CMV/EBV-Reaktivierung für länger als 2 aufeinanderfolgende Wochen bzw. für BKPyV der Nachweis von Virusreplikation in Urin und Plasma und/oder eine BKPyV-assoziierte Zystitis.

Die Zellzahl der Leukozyten, Lymphozyten und Neutrophilen im peripheren Blut wurde ebenfalls in der Auswertung einbezogen.

Das Ende der Neutropenie in dieser Studie, d.h. der Zeitpunkt an dem Neutrophilen-Zellzahl über dem Cutoff von 500/ $\mu$ L lag, wurde mit dem Median von 17 Tagen (Range von 12 bis 41 Tagen) nach allo-HSZT erreicht. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem von der Literatur beschriebenen durchschnittlichen Zeitintervall von +9 bis +19 Tagen<sup>36,37</sup>.

Patienten der Niedrigrisikogruppe zeigten innerhalb der Gruppe zum Teil starke Variationen der Kinetik der TTV-Virämie und der Leukozyten-Untergruppen. An Tag +30 betrug die TTV-Viruskonzentration dieser Gruppe einen signifikant niedrigeren Wert als die der Hochrisikogruppe ( $p=0,005$ ). Die Ergebnisse analoger Studien, die den erhöhten TTV-Titer mit den Auswirkungen von GvHD und/oder deren Behandlung verknüpfen<sup>155,156</sup> bestätigen dies. Insbesondere korreliert zu dem Zeitpunkt +30 der Nachweis einer TTV-DNA-Kopienzahl von weniger als 3.0E+08 Kopien/mL kombiniert mit einer Lymphozytenzahl von mehr als 5,5E+08 Zellen/L mit einer niedrigen Inzidenz von Posttransplantationskomplika-tionen. Im Falle einer Nicht-TTV-Virusreaktivierung konnte diese Infektion schnell kontrolliert werden, virale DNA im Blut persistierte für weniger als 2 Wochen.

Anhand der nachgewiesenen niedrigeren TTV-Viruslast in der Gruppe mit niedrigem Risiko im Vergleich zur Gruppe mit hohem Risiko lässt sich schlussfolgern, dass das Immunsystem erst genannter Gruppe eine höhere Fähigkeit zur Kontrolle viraler Replikation hat. Bestätigen lässt sich diese Schlussfolgerung durch die niedrigere Inzidenz und Ausprägung der CMV-, EBV- und BKPyV-Reaktivierung. Das geringere Auftreten von Virusinfektionen könnte teilweise die geringere Häufigkeit von akuten GvHDs erklären. Frühere Arbeiten zeigten bereits, dass die GvHD und deren Therapie eine CMV-Replikation induzieren kann. Entzündungsreaktionen können eine auslösende Wirkung auf Infektionen in der Anfangsphase einer GvHD haben<sup>144,157</sup>. Zwischen Tag +30 und +100 konnte eine Zunahme der TTV-Virämie in beiden Gruppen beobachtet werden. An Tag +100 erschien die Differenz der TTV-Viruslast zwischen beiden Gruppen weniger prominent. Bei den Hochrisikopatienten waren vergleichsweise höhere TTV-Titer nachweisbar. Die Zunahme der TTV-Virämie zwischen Tag +30 und +100 verbunden mit einer gleichzeitigen Normalisierung der Lymphozytenzahl war gruppenunabhängig zu beobachten.

Nach bisherigem Verständnis stellen die HSZ die Hauptquelle für die TTV-Replikation in Patienten mit allo-HSZT dar<sup>158</sup>. In einer Plasma-Analyse mit allo-HSZT-Empfängern ließ sich ein stetiger Rückgang der TTV-Werte während der Myelosuppressionsphase - also nach der Konditionierung - feststellen. Ab Tag +26 ging mit einem Anstieg der Leukozyten im peripheren Blut parallel ein Anstieg der TTV-Virämie einher<sup>158</sup>.

In einer Folgestudie mit Organtransplantierten konnte gezeigt werden, dass TTV ebenfalls Lymphozyten infiziert<sup>117</sup>. Diese Ergebnisse unterstreichen die erzielten Resultate der vorliegenden Studie, bei der die steigende Lymphozytenzahl mit einer ansteigenden TTV-Virämie zwischen Tag +30 und +100 einhergeht.

Aus den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich ableiten, dass beide Zelltypen, also HSZ und periphere Lymphozyten, an der Aufrechterhaltung der TTV-Virämie nach allo-HSZT beteiligt sind.

Die vorliegende Studie konnte darüber hinaus ab Tag +100 einen Abfall der TTV-Werte in beiden untersuchten Gruppen anzeigen. Die TTV-Viruslast sank an Tag +200 auf ein vergleichbares Level beider Gruppen. Somit ließe sich für diesen Zeitpunkt schlussfolgern, dass sich hier das Immunsystem der Mehrheit aller allo-HSZT-Empfänger regeneriert hat, um die TTV-Replikation zu kontrollieren und damit die Viruslast auf ein niedriges Niveau abzusenken.

### **4.3 Bedeutung der Analyse für die allogene Stammzelltherapie**

In dieser Arbeit wird die Assoziation zwischen der TTV-Viruslast in der frühen Posttransplantationsphase und der Inzidenz von Transplantationskomplikationen, die Nicht-TTV-Virus-Reaktivierungen und GvHD, deutlich. Der Nachweis einer TTV-Kopienzahl im Blut von mehr als  $3.0E+08$  Kopien/mL an Tag +30 liefert prädiktive Informationen für den weiteren Verlauf der Posttransplantationsphase. Diese TTV-Viruslast muss als Warnhinweis für bereits aufgeführte Komplikationen verstanden werden.

Als Konsequenz sollte bei stammzelltransplantierten Patienten ab Beginn der myeloablativen Konditionierung routinemäßig die Analyse nach TTV-DNA mittels PCR erfolgen. Die Kombination aus erhöhter Viruslast und einer Lymphozytenzahl von weniger als  $5,5E+08$  Zellen/L an Tag +30 sollte als Ausdruck einer viralen Infektion von klinischer Relevanz beurteilt werden. Im weiteren Vorgehen sollten diese Ergebnisse in einen Kontext mit der Kopienanzahl der Nicht-TTV-Viren gesetzt werden. Zusammengefasst erlaubt dies eine Einschätzung des Risikoprofils und die Vorhersage der Komplikationsentwicklung.

Die Betrachtung aktueller Analysen aus dem Jahr 2020 zeigt durch widersprüchliche Ergebnisse das bisher noch begrenzte Wissen auf diesem Gebiet und die Notwendigkeit weiterer Evaluierung. In einer retrospektiven Studie untersuchten Schmitz et al. TTV als frühen prognostischen Marker vor Tag +50 nach allo-HSZT. Die Arbeitsgruppe nimmt an, dass multifaktorielle Einflussfaktoren wie z.B. die Grunderkrankung, die Vorbehandlung, die Konditionierung und die immunsuppressiven Maßnahmen die Viruslast und deren Dynamik bestimmen. Schmitz und Kollegen lehnen anhand ihrer Ergebnisse die Hypothese ab, dass TTV als prognostischer Marker zur Vorhersage der Immunsuppression als auch für klinisch kritische Ereignisse nach allo-HSZT genutzt werden kann<sup>159</sup>.

Demgegenüber steht die prospektive Studie von Pradier et al. mit einem Kollektiv von 168 Patienten. Sie postulierten, dass hohe TTV-Titer an Tag +100 ein niedrigeres Gesamtüberleben und ein erhöhtes Risiko für GvHD und Infektionen sowie möglicherweise ein Rezidiv anzeigen<sup>156</sup>. Dabei gelte Tag +100 als ein geeigneter Zeitpunkt für die Nutzung von TTV-Titern als Biomarker, weil hier das Maximum der Replikation erreicht sei und diese eher vom Grad der Immunrekonstitution als von Faktoren vor der Transplantation beeinflusst wird. Andererseits sei dies der Zeitpunkt, an dem Entscheidungen hinsichtlich der Dauer der immunsuppressiven Behandlung, der antimikrobiellen Prophylaxe und der Immunintervention getroffen werden. Pradier und Kollegen überwinden unter Verwendung multivariabler Analysen einige Einschränkungen, die in vorausgegangenen Studien aufgetreten sind und bestätigen, dass TTV als ein potenziell nützlicher Biomarker zur Beurteilung der Immunrekonstitution und zur Vorhersage von Komplikationen und Ergebnissen allogener-HSZT genutzt werden kann. Als Faktoren, die die Dynamik der TTV-Replikation beeinflussen wird der positive CMV-Serostatus des Spenders, der Spendertyp (höhere TTV-Viruslast für MMUD vs. SIB und MUD vs. SIB) und die Immunsuppression infolge einer GvHD-Therapie festgelegt.

Die Grundlage der vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit dient als essenzieller Baustein der Therapiefindung zu zielgerichteten Prophylaxen und frühzeitigen therapeutischen Maßnahmen der allogenen Stammzelltherapie. Die individuelle Therapie sollte auf Basis der vereinten Daten variiert und adaptiert werden. Dies erfordert das flexible Reagieren auf die Vielzahl der untersuchten Parameter.

Den Patienten, die der Gruppe mit erhöhtem Risiko zugeteilt wurden, sollte höchste Achtsamkeit geschenkt werden um ihnen eine schnellstmögliche Anpassung der Therapie gewährleisten zu können.

Die erworbenen Erkenntnisse dieser Arbeit konnten bereits als wegweisende Analyse für weitere Studien dienen. Für weitere notwendige klinische Studien, in denen das Anpassen der immunsuppressiven Arzneimittel an die TTV-Titer beurteilt werden, kann diese Arbeit das Fundament bilden.

#### **4.4 Limitationen**

Angesichts des Mangels an systematischen Analysen über die Dynamik von TTV in allo-HSZT Empfängern, präsentiert diese Studie die ersten vielversprechenden Daten einer retrospektiven Analyse. Dennoch weist die Studie einige Limitationen auf. Als primärer Kritikpunkt ist die geringe Kohortengröße anzusehen, zumal die Patienten für die Betrachtung der Dynamik der viralen Reaktivierung weiterhin in die zwei Untergruppen „niedriges Risiko“ und „hohes Risiko“ aufgeteilt wurden. Aufgrund der geringen Anzahl an eingeschlossenen Studienprobanden konnten keine multifaktoriellen Korrelationen durchgeführt werden.

Die Verwendung retrospektiv erhobener Daten schränkt die Aussagekraft dieser Arbeit in einigen Punkten ein<sup>160</sup>. Das Belegen von kausalen Zusammenhängen ist aufgrund von Bias (Verzerrungen) und sogenannten Confounder (Scheinbeziehungen) nicht zulässig. Die erzielten Ergebnisse können jedoch zur Generierung von Hypothesen dienen oder empirische Evidenz zur Bekräftigung von Hypothesen liefern.

Einschränkungen für die Vollständigkeit der dokumentierten Daten, z.B. der Lymphozyten Subpopulationen sind durch den retrospektiven Charakter gegeben. Für künftige Studien gilt es prospektive Studienmodelle anzustreben. Diese Untersuchungen sollten dann eine größere Anzahl von Patienten mit längerer Nachbeobachtung und mehr Parametern einschließen. Dies trüge dazu bei, die pathophysiologischen Prozesse mit ihrer klinischen Ausprägung besser zu verstehen. Das bisherige Wissen über den kausalen Zusammenhang der Anwendung von TTV-DNA als Teil der immunologischen Überwachung nach allo-HSZT befindet sich derzeit im Anfangsstadium und ist ausbaufähig. Zukünftige multizentrische klinische Studien zur Untersuchung der TTV-Titer als Biomarker für die Immunrekonstitution nach allo-HSZT werden zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den Zentren auf die Verwendung standardisierter Methoden zurückgreifen. Ein kommerzielles Kit zur TTV-Quantifizierung wird von Pradier und Kollegen hierfür vorgeschlagen<sup>156</sup>.

Fazit dieser Arbeit, trotz erwähnten Einschränkungen, ist die Erkenntnisgewinnung über die Rolle der TTV-Dynamik als Marker zur Therapiefindung nach allogener Stammzelltransplantation.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Urbano-Ispizua A, Schmitz N, de Witte T, et al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. *Bone Marrow Transplant* 2002; **29**(8): 639-46.
2. Jacobson LO, Marks EK, Robson M, Zirkle RE. The effect of spleen protection on mortality following x-irradiation. Country unknown/Code not available, 1949.
3. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 1951; **12**(1): 197-201.
4. Thomas ED, Lochte HL, Jr., Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest* 1959; **38**(10 Pt 1-2): 1709-16.
5. Thomas ED, Lochte HL, Jr., Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1957; **257**(11): 491-6.
6. Bach FH, Albertini RJ, Joo P, Anderson JL, Bortin MM. Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet* 1968; **2**(7583): 1364-6.
7. Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1968; **2**(7583): 1366-9.
8. Gratwohl A. Bone marrow transplantation activity in Europe 1990. European Group for Bone Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant* 1991; **8**(3): 197-201.
9. Passweg JR, Baldomero H, Chabannon C, et al. Hematopoietic cell transplantation and cellular therapy survey of the EBMT: monitoring of activities and trends over 30 years. *Bone Marrow Transplantation* 2021.
10. Andrews RG, Bryant EM, Bartelmez SH, et al. CD34+ marrow cells, devoid of T and B lymphocytes, reconstitute stable lymphopoiesis and myelopoiesis in lethally irradiated allogeneic baboons. *Blood* 1992; **80**(7): 1693-701.
11. Link H, Arseniev L, Bähre O, et al. Combined Transplantation of Allogeneic Bone Marrow and CD34+ Blood Cells. *Blood* 1995; **86**(7): 2500-8.
12. Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, et al. Transplantation of Bone Marrow as Compared with Peripheral-Blood Cells from HLA-Identical Relatives in Patients with Hematologic Cancers. *New England Journal of Medicine* 2001; **344**(3): 175-81.
13. Olavarria E, Kanfer EJ. Selection and use of chemotherapy with hematopoietic growth factors for mobilization of peripheral blood progenitor cells. *Curr Opin Hematol* 2000; **7**(3): 191-6.
14. Körbling M, Anderlini P. Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? *Blood* 2001; **98**(10): 2900-8.
15. Talmadge J, Reed E, Ino K, et al. Rapid immunologic reconstitution following transplantation with mobilized peripheral blood stem cells as compared to bone marrow. *Bone marrow transplantation* 1997; **19**: 161-72.
16. Roberts MM, To LB, Gillis D, et al. Immune reconstitution following peripheral blood stem cell transplantation, autologous bone marrow transplantation and allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1993; **12**(5): 469-75.
17. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, et al. Increased Incidence of Chronic Graft-Versus-Host Disease (GVHD) and No Survival Advantage with Filgrastim-Mobilized Peripheral Blood Stem Cells (PBSC) Compared to Bone Marrow (BM) Transplants From Unrelated Donors: Results of Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network (BMT CTN) Protocol 0201, a Phase III, Prospective, Randomized Trial. *Blood* 2011; **118**(21): 1-.
18. Montgomery F, Scriba P, Cichutek K, Hallek M. Richtlinie zur Herstellung und Anwendung von hämatopoetischen Stammzellzubereitungen – Erste Fortschreibung. *Bundesärztekammer Deutsches Ärzteblatt* 2019; **116**(11).
19. Rocha V, Cornish J, Sievers EL, et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 2001; **97**(10): 2962-71.

20. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987; **329**(6139): 512-8.
21. Beck S, Trowsdale J. The human major histocompatibility complex: lessons from the DNA sequence. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000; **1**: 117-37.
22. Choo SY. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med J* 2007; **48**(1): 11-23.
23. Sasazuki T, Juji T, Morishima Y, et al. Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor. Japan Marrow Donor Program. *N Engl J Med* 1998; **339**(17): 1177-85.
24. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 2007; **110**(13): 4576-83.
25. Spellman S, Setterholm M, Maiers M, et al. Advances in the selection of HLA-compatible donors: refinements in HLA typing and matching over the first 20 years of the National Marrow Donor Program Registry. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; **14**(9 Suppl): 37-44.
26. Rosenmayr A, Pointner-Prager M, Mitterschiffthaler A, et al. What are a patient's current chances of finding a matched unrelated donor? Twenty years' central search experience in a small country. *Bone Marrow Transplant* 2012; **47**(2): 172-80.
27. Cornelissen JJ, Gratwohl A, Schlenk RF, et al. The European LeukemiaNet AML Working Party consensus statement on allogeneic HSCT for patients with AML in remission: an integrated-risk adapted approach. *Nat Rev Clin Oncol* 2012; **9**(10): 579-90.
28. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, et al. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; **15**(12): 1628-33.
29. Maris MB, Niederwieser D, Sandmaier BM, et al. HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning for patients with hematologic malignancies. *Blood* 2003; **102**(6): 2021-30.
30. Khouri IF, Keating M, Körbling M, et al. Transplant-lite: induction of graft-versus-malignancy using fludarabine-based nonablative chemotherapy and allogeneic blood progenitor-cell transplantation as treatment for lymphoid malignancies. *J Clin Oncol* 1998; **16**(8): 2817-24.
31. Storb R. Nonmyeloablative preparative regimens: how relevant for acute myelogenous leukemia? *Leukemia* 2001; **15**(4): 662-3.
32. Ballen KK, Colvin G, Porter D, Quesenberry PJ. Low dose total body irradiation followed by allogeneic lymphocyte infusion for refractory hematologic malignancy--an updated review. *Leuk Lymphoma* 2004; **45**(5): 905-10.
33. Lowsky R, Takahashi T, Liu YP, et al. Protective conditioning for acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2005; **353**(13): 1321-31.
34. Wolff SN. Second hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of graft failure, graft rejection or relapse after allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; **29**(7): 545-52.
35. Teltschik HM, Heinzelmann F, Gruhn B, et al. Treatment of graft failure with TNI-based reconditioning and haploidentical stem cells in paediatric patients. *Br J Haematol* 2016; **175**(1): 115-22.
36. Mahmoud HK, Fahmy OA, Kamel A, Kamel M, El-Haddad A, El-Kadi D. Peripheral blood vs bone marrow as a source for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 1999; **24**(4): 355-8.
37. Couban S, Simpson DR, Barnett MJ, et al. A randomized multicenter comparison of bone marrow and peripheral blood in recipients of matched sibling allogeneic transplants for myeloid malignancies. *Blood* 2002; **100**(5): 1525-31.
38. Schmitz N, Beksac M, Hasenclever D, et al. Transplantation of mobilized peripheral blood cells to HLA-identical siblings with standard-risk leukemia. *Blood* 2002; **100**(3): 761-7.
39. Vigorito AC, Marques Júnior JF, Aranha FJ, Oliveira GB, Miranda EC, De Souza CA. A randomized, prospective comparison of allogeneic bone marrow and peripheral blood

- progenitor cell transplantation in the treatment of hematologic malignancies: an update. *Haematologica* 2001; **86**(6): 665-6.
40. Storek J, Geddes M, Khan F, et al. Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. *Semin Immunopathol* 2008; **30**(4): 425-37.
  41. Williams KM, Hakim FT, Gress RE. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. *Semin Immunol* 2007; **19**(5): 318-30.
  42. Krenger W, Blazar BR, Holländer GA. Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2011; **117**(25): 6768-76.
  43. Park BG, Park CJ, Jang S, et al. Reconstitution of lymphocyte subpopulations after hematopoietic stem cell transplantation: comparison of hematologic malignancies and donor types in event-free patients. *Leuk Res* 2015; **39**(12): 1334-41.
  44. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; **11**(12): 945-56.
  45. Goldstone AH, Richards SM, Lazarus HM, et al. In adults with standard-risk acute lymphoblastic leukemia, the greatest benefit is achieved from a matched sibling allogeneic transplantation in first complete remission, and an autologous transplantation is less effective than conventional consolidation/maintenance chemotherapy in all patients: final results of the International ALL Trial (MRC UKALL XII/ECOG E2993). *Blood* 2008; **111**(4): 1827-33.
  46. Zeiser R, Blazar BR. Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy. *N Engl J Med* 2017; **377**(22): 2167-79.
  47. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *The Lancet* 2009; **373**(9674): 1550-61.
  48. Markey KA, MacDonald KP, Hill GR. The biology of graft-versus-host disease: experimental systems instructing clinical practice. *Blood* 2014; **124**(3): 354-62.
  49. Cooke KR, Luznik L, Sarantopoulos S, et al. The Biology of Chronic Graft-versus-Host Disease: A Task Force Report from the National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017; **23**(2): 211-34.
  50. Antin JH, Ferrara JL. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood* 1992; **80**(12): 2964-8.
  51. Jacobsohn DA, Vogelsang GB. Acute graft versus host disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2007; **2**(1): 35.
  52. Sullivan KM, Shulman HM, Storb R, et al. Chronic graft-versus-host disease in 52 patients: adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression. *Blood* 1981; **57**(2): 267-76.
  53. Lee SJ, Vogelsang G, Flowers ME. Chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; **9**(4): 215-33.
  54. Akpek G, Zahurak ML, Piantadosi S, et al. Development of a prognostic model for grading chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2001; **97**(5): 1219-26.
  55. Blaise D, Kuentz M, Fortanier C, et al. Randomized trial of bone marrow versus lenograstim-primed blood cell allogeneic transplantation in patients with early-stage leukemia: a report from the Société Française de Greffe de Moelle. *J Clin Oncol* 2000; **18**(3): 537-46.
  56. Storb R, Prentice RL, Sullivan KM, et al. Predictive Factors in Chronic Graft-Versus-Host Disease in Patients with Aplastic Anemia Treated by Marrow Transplantation from HLA-Identical Siblings. *Annals of Internal Medicine* 1983; **98**(4): 461-6.
  57. Ringdén O, Paulin T, Lönnqvist B, Nilsson B. An analysis of factors predisposing to chronic graft-versus-host disease. *Exp Hematol* 1985; **13**(10): 1062-7.
  58. Ochs LA, Miller WJ, Filipovich AH, et al. Predictive factors for chronic graft-versus-host disease after histocompatible sibling donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1994; **13**(4): 455-60.
  59. Randolph SS, Gooley TA, Warren EH, Appelbaum FR, Riddell SR. Female donors contribute to a selective graft-versus-leukemia effect in male recipients of HLA-matched, related hematopoietic stem cell transplants. *Blood* 2004; **103**(1): 347-52.

60. Cutler C, Giri S, Jeyapalan S, Paniagua D, Viswanathan A, Antin JH. Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem-cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 2001; **19**(16): 3685-91.
61. Kollman C, Howe CW, Anasetti C, et al. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood* 2001; **98**(7): 2043-51.
62. Flowers MED, Vogelsang GB. Clinical Manifestations and Natural History. In: Vogelsang GB, Pavletic SZ, eds. *Chronic Graft Versus Host Disease: Interdisciplinary Management*. Cambridge: Cambridge University Press; 2009: 56-69.
63. Finke J, Bethge WA, Schmoor C, et al. Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 2009; **10**(9): 855-64.
64. Wolff D, Ayuk F, Elmaagacli A, et al. Current practice in diagnosis and treatment of acute graft-versus-host disease: results from a survey among German-Austrian-Swiss hematopoietic stem cell transplant centers. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013; **19**(5): 767-76.
65. Taneja A, Chewning JH, Saad A. Viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *ADVANCES IN CELL AND GENE THERAPY* 2019; **2**(2): e43.
66. Einsele H, Bertz H, Beyer J, et al. Infectious complications after allogeneic stem cell transplantation: epidemiology and interventional therapy strategies--guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). *Ann Hematol* 2003; **82 Suppl 2**(Suppl 2): S175-85.
67. Sahin U, Toprak SK, Atilla PA, Atilla E, Demirer T. An overview of infectious complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Infect Chemother* 2016; **22**(8): 505-14.
68. Krech U. Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world. *Bull World Health Organ* 1973; **49**(1): 103-6.
69. Griffiths PD, Clark DA, Emery VC. Betaherpesviruses in transplant recipients. *J Antimicrob Chemother* 2000; **45 Suppl T3**: 29-34.
70. Handsfield HH, Chandler SH, Caine VA, et al. Cytomegalovirus infection in sex partners: evidence for sexual transmission. *J Infect Dis* 1985; **151**(2): 344-8.
71. Prince AM, Szmunes W, Millian SJ, David DS. A Serologic Study of Cytomegalovirus Infections Associated with Blood Transfusions. *New England Journal of Medicine* 1971; **284**(20): 1125-31.
72. Razonable RR, Humar A. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2013; **13 Suppl 4**: 93-106.
73. Boeckh M, Nichols WG, Papanicolaou G, Rubin R, Wingard JR, Zaia J. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; **9**(9): 543-58.
74. Ljungman P, Brand R, Hoek J, et al. Donor cytomegalovirus status influences the outcome of allogeneic stem cell transplant: a study by the European group for blood and marrow transplantation. *Clin Infect Dis* 2014; **59**(4): 473-81.
75. Cho SY, Lee DG, Kim HJ. Cytomegalovirus Infections after Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Current Status and Future Immunotherapy. *Int J Mol Sci* 2019; **20**(11).
76. Chemaly RF, Ullmann AJ, Ehninger G. CMV prophylaxis in hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2014; **371**(6): 576-7.
77. Marty FM, Ljungman P, Chemaly RF, et al. Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med* 2017; **377**(25): 2433-44.
78. Boeckh M, Murphy WJ, Peggs KS. Recent advances in cytomegalovirus: an update on pharmacologic and cellular therapies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; **21**(1): 24-9.
79. Bowden RA, Slichter SJ, Sayers MH, Mori M, Cays MJ, Meyers JD. Use of leukocyte-depleted platelets and cytomegalovirus-seronegative red blood cells for prevention of primary cytomegalovirus infection after marrow transplant. *Blood* 1991; **78**(1): 246-50.
80. Egli A, Infanti L, Dumoulin A, et al. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis* 2009; **199**(6): 837-46.

81. Goudsmit J, Baak ML, Sletterus KW, Van der Noordaa J. Human papovavirus isolated from urine of a child with acute tonsillitis. *British Medical Journal (Clinical research ed)* 1981; **283**(6303): 1363.
82. Wiseman AC. Polyomavirus nephropathy: a current perspective and clinical considerations. *Am J Kidney Dis* 2009; **54**(1): 131-42.
83. Dörries K, Vogel E, Günther S, Czub S. Infection of human polyomaviruses JC and BK in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. *Virology* 1994; **198**(1): 59-70.
84. Goudsmit J, Wertheim-van Dillen P, van Strien A, van der Noordaa J. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J Med Virol* 1982; **10**(2): 91-9.
85. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1971; **1**(7712): 1253-7.
86. Bedi A, Miller CB, Hanson JL, et al. Association of BK virus with failure of prophylaxis against hemorrhagic cystitis following bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1995; **13**(5): 1103-9.
87. Mani J, Jin N, Schmitt M. Cellular immunotherapy for patients with reactivation of JC and BK polyomaviruses after transplantation. *Cytotherapy* 2014; **16**(10): 1325-35.
88. Leung AY, Yuen KY, Kwong YL. Polyoma BK virus and haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplantation: a changing paradigm. *Bone Marrow Transplant* 2005; **36**(11): 929-37.
89. Giraud G, Bogdanovic G, Priftakis P, et al. The incidence of hemorrhagic cystitis and BK-viruria in allogeneic hematopoietic stem cell recipients according to intensity of the conditioning regimen. *Haematologica* 2006; **91**(3): 401-4.
90. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *Lancet* 1964; **1**(7335): 702-3.
91. Spacek M, Hubacek P, Markova J, et al. Plasma EBV-DNA monitoring in Epstein-Barr virus-positive Hodgkin lymphoma patients. *Apmis* 2011; **119**(1): 10-6.
92. Stevens SJ, Verkuijlen SA, Hariwiyanto B, et al. Diagnostic value of measuring Epstein-Barr virus (EBV) DNA load and carcinoma-specific viral mRNA in relation to anti-EBV immunoglobulin A (IgA) and IgG antibody levels in blood of nasopharyngeal carcinoma patients from Indonesia. *J Clin Microbiol* 2005; **43**(7): 3066-73.
93. Sotzny F, Blanco J, Capelli E, et al. Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome - Evidence for an autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 2018; **17**(6): 601-9.
94. Taylor GS, Long HM, Brooks JM, Rickinson AB, Hislop AD. The immunology of Epstein-Barr virus-induced disease. *Annu Rev Immunol* 2015; **33**: 787-821.
95. Cohen JL. Epstein-Barr Virus Infection. *New England Journal of Medicine* 2000; **343**(7): 481-92.
96. Parker A, Bowles K, Bradley JA, et al. Diagnosis of post-transplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients - BCSH and BTS Guidelines. *Br J Haematol* 2010; **149**(5): 675-92.
97. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **241**(1): 92-7.
98. Hino S. TTV, a new human virus with single stranded circular DNA genome. *Rev Med Virol* 2002; **12**(3): 151-8.
99. Itoh Y, Takahashi M, Fukuda M, et al. Visualization of TT virus particles recovered from the sera and feces of infected humans. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **279**(2): 718-24.
100. Mushahwar IK, Erker JC, Muerhoff AS, et al. Molecular and biophysical characterization of TT virus: Evidence for a new virus family infecting humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999; **96**(6): 3177.
101. Okamoto H, Nishizawa T, Takahashi M, Asabe S, Tsuda F, Yoshikawa A. Heterogeneous distribution of TT virus of distinct genotypes in multiple tissues from infected humans. *Virology* 2001; **288**(2): 358-68.

102. Peng YH, Nishizawa T, Takahashi M, Ishikawa T, Yoshikawa A, Okamoto H. Analysis of the entire genomes of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants. *Arch Virol* 2002; **147**(1): 21-41.
103. Hsiao K-L, Wang L-Y, Lin C-L, Liu H-F. New Phylogenetic Groups of Torque Teno Virus Identified in Eastern Taiwan Indigenous. *PLOS ONE* 2016; **11**(2): e0149901.
104. Ball JK, Curran R, Berridge S, et al. TT virus sequence heterogeneity in vivo: evidence for co-infection with multiple genetic types. *J Gen Virol* 1999; **80** ( Pt 7): 1759-68.
105. Erker JC, Leary TP, Desai SM, Chalmers ML, Mushahwar IK. Analyses of TT virus full-length genomic sequences. *J Gen Virol* 1999; **80** ( Pt 7): 1743-50.
106. Gallian P, Berland Y, Olmer M, et al. TT virus infection in French hemodialysis patients: study of prevalence and risk factors. *J Clin Microbiol* 1999; **37**(8): 2538-42.
107. Bendinelli M, Pistello M, Maggi F, Fornai C, Freer G, Vatteroni ML. Molecular properties, biology, and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. *Clin Microbiol Rev* 2001; **14**(1): 98-113.
108. Haloschan M, Bettesch R, Görzer I, Weseslindtner L, Kundi M, Puchhammer-Stöckl E. TTV DNA plasma load and its association with age, gender, and HCMV IgG serostatus in healthy adults. *Age (Dordr)* 2014; **36**(5): 9716.
109. Okamoto H. History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009; **331**: 1-20.
110. Focosi D, Antonelli G, Pistello M, Maggi F. Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. *Clin Microbiol Infect* 2016; **22**(7): 589-93.
111. Focosi D, Spezia PG, Macera L, et al. Assessment of prevalence and load of torquetenovirus viraemia in a large cohort of healthy blood donors. *Clin Microbiol Infect* 2020; **26**(10): 1406-10.
112. Burra P, Masier A, Boldrin C, et al. Torque Teno Virus: any pathological role in liver transplanted patients? *Transpl Int* 2008; **21**(10): 972-9.
113. Moen EM, Sagedal S, Bjørø K, Degré M, Opstad PK, Grinde B. Effect of immune modulation on TT virus (TTV) and TTV-like-mini-virus (TLMV) viremia. *Journal of Medical Virology* 2003; **70**(1): 177-82.
114. Maggi F, Fornai C, Zaccaro L, et al. TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells. *J Med Virol* 2001; **64**(2): 190-4.
115. Okamura A, Yoshioka M, Kubota M, Kikuta H, Ishiko H, Kobayashi K. Detection of a novel DNA virus (TTV) sequence in peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol* 1999; **58**(2): 174-7.
116. Kikuchi K, Miyakawa H, Abe K, et al. Indirect evidence of TTV replication in bone marrow cells, but not in hepatocytes, of a subacute hepatitis/aplastic anemia patient. *J Med Virol* 2000; **61**(1): 165-70.
117. Focosi D, Macera L, Boggi U, Nelli LC, Maggi F. Short-term kinetics of torque teno virus viraemia after induction immunosuppression confirm T lymphocytes as the main replication-competent cells. *Journal of General Virology* 2015; **96**(1): 115-7.
118. Wang JT, Lee C, Kao J-H, Sheu J, Wang T, Chen D. Incidence and clinical presentation of posttransfusion TT virus infection in prospectively followed transfusion recipients: Emphasis on its relevance to hepatitis. *Transfusion* 2000; **40**: 596-601.
119. Maeda M, Hamada H, Tsuda A, Kaneko K, Fukunaga Y. High rate of TTV infection in multitransfused patients with pediatric malignancy and hematological disorders. *American Journal of Hematology* 2000; **65**(1): 41-4.
120. Alzahrani AJ, Dela Cruz DM, Obeid OE, Bukhari HA, Al-Qahtani AA, Al-Ahdal MN. Molecular detection of hepatitis B, hepatitis C, and torque teno viruses in drug users in Saudi Arabia. *J Med Virol* 2009; **81**(8): 1343-7.
121. Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, et al. Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *J Med Virol* 1998; **56**(2): 128-32.
122. Chung JY, Han TH, Koo JW, Kim SW, Seo JK, Hwang ES. Small anellovirus infections in Korean children. *Emerg Infect Dis* 2007; **13**(5): 791-3.
123. Chikasue K, Kimura M, Ikeda K, et al. Detection of Torque teno virus DNA in exhaled breath by polymerase chain reaction. *Acta Med Okayama* 2012; **66**(5): 387-97.

124. Inami T, Konomi N, Arakawa Y, Abe K. High Prevalence of TT Virus DNA in Human Saliva and Semen. *J Clin Microbiol* 2000; **38**(6): 2407.
125. Goto K, Sugiyama K, Ando T, et al. Detection rates of TT virus DNA in serum of umbilical cord blood, breast milk and saliva. *Tohoku J Exp Med* 2000; **191**(4): 203-7.
126. Osioy C, Sauder C. Detection of TT virus in human hair and skin. *Hepatology Research* 2000; **16**(2): 155-62.
127. Morrica A, Maggi F, Vatteroni ML, et al. TT Virus: Evidence for Transplacental Transmission. *The Journal of infectious diseases* 2000; **181**: 803-4.
128. Thom K, Petrik J. Progression towards AIDS leads to increased Torque teno virus and Torque teno minivirus titers in tissues of HIV infected individuals. *J Med Virol* 2007; **79**(1): 1-7.
129. Walton AH, Muenzer JT, Rasche D, et al. Reactivation of multiple viruses in patients with sepsis. *PLoS one* 2014; **9**(2): e98819-e.
130. Maggi F, Andreoli E, Riente L, et al. Torquetenovirus in patients with arthritis. *Rheumatology* 2007; **46**(5): 885-6.
131. Zhong S, Yeo W, Tang MW, et al. Gross elevation of TT virus genome load in the peripheral blood mononuclear cells of cancer patients. *Ann N Y Acad Sci* 2001; **945**: 84-92.
132. Görzer I, Jaksch P, Kundi M, Seitz T, Klepetko W, Puchhammer-Stöckl E. Pre-transplant plasma Torque Teno virus load and increase dynamics after lung transplantation. *PLoS One* 2015; **10**(3): e0122975.
133. Focosi D, Macera L, Pistello M, Maggi F. Torque Teno virus viremia correlates with intensity of maintenance immunosuppression in adult orthotopic liver transplant. *J Infect Dis* 2014; **210**(4): 667-8.
134. Madsen CD, Eugen-Olsen J, Kirk O, et al. TTV viral load as a marker for immune reconstitution after initiation of HAART in HIV-infected patients. *HIV Clin Trials* 2002; **3**(4): 287-95.
135. Strassl R, Schiemann M, Doberer K, et al. Quantification of Torque Teno Virus Viremia as a Prospective Biomarker for Infectious Disease in Kidney Allograft Recipients. *J Infect Dis* 2018; **218**(8): 1191-9.
136. Jaksch P, Kundi M, Görzer I, et al. Torque Teno Virus as a Novel Biomarker Targeting the Efficacy of Immunosuppression After Lung Transplantation. *The Journal of Infectious Diseases* 2018; **218**(12): 1922-8.
137. Martín-López M, Albert E, Fernández-Ruiz M, et al. Torque teno virus viremia in patients with chronic arthritis: Influence of biologic therapies. *Semin Arthritis Rheum* 2020; **50**(1): 166-71.
138. Servais S, Porcher R, Xhaard A, et al. Pre-transplant prognostic factors of long-term survival after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with matched related/unrelated donors. *Haematologica* 2014; **99**(3): 519-26.
139. Giebel S, Labopin M, Socié G, et al. Improving results of allogeneic hematopoietic cell transplantation for adults with acute lymphoblastic leukemia in first complete remission: an analysis from the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica* 2017; **102**(1): 139-49.
140. Ribera J-M. Allogeneic stem cell transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia: when and how. *Haematologica* 2011; **96**(8): 1083-6.
141. Nakasone H, Remberger M, Tian L, et al. Risks and benefits of sex-mismatched hematopoietic cell transplantation differ according to conditioning strategy. *Haematologica* 2015; **100**(11): 1477-85.
142. Kim HT, Zhang MJ, Woolfrey AE, et al. Donor and recipient sex in allogeneic stem cell transplantation: what really matters. *Haematologica* 2016; **101**(10): 1260-6.
143. Arnaout K, Patel N, Jain M, El-Amm J, Amro F, Tabbara IA. Complications of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Invest* 2014; **32**(7): 349-62.
144. Miller HK, Braun TM, Stillwell T, et al. Infectious Risk after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Complicated by Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017; **23**(3): 522-8.
145. Greco R, Ciceri F, Noviello M, et al. Immune monitoring in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: a survey from the EBMT-CTIWP. *Bone Marrow Transplant* 2018; **53**(9): 1201-5.

146. Mohty B, Bel M, Vukicevic M, et al. Graft-versus-host disease is the major determinant of humoral responses to the AS03-adjuvanted influenza A/09/H1N1 vaccine in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Haematologica* 2011; **96**(6): 896-904.
147. Shibayama T, Masuda G, Ajisawa A, et al. Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. *Aids* 2001; **15**(5): 563-70.
148. Görzer I, Haloschan M, Jaksch P, Klepetko W, Puchhammer-Stöckl E. Plasma DNA levels of Torque teno virus and immunosuppression after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2014; **33**(3): 320-3.
149. Focosi D, Maggi F, Albani M, et al. Torquetenovirus viremia kinetics after autologous stem cell transplantation are predictable and may serve as a surrogate marker of functional immune reconstitution. *Journal of Clinical Virology* 2010; **47**(2): 189-92.
150. Fernández-Ruiz M, Albert E, Giménez E, et al. Monitoring of alphatorquevirus DNA levels for the prediction of immunosuppression-related complications after kidney transplantation. *American Journal of Transplantation* 2019; **19**(4): 1139-49.
151. Reza Hosseini O, Drabe CH, Sørensen SS, et al. Torque-Teno virus viral load as a potential endogenous marker of immune function in solid organ transplantation. *Transplantation Reviews* 2019; **33**(3): 137-44.
152. Schiemann M, Puchhammer-Stöckl E, Eskandary F, et al. Torque Teno Virus Load-Inverse Association With Antibody-Mediated Rejection After Kidney Transplantation. *Transplantation* 2017; **101**(2): 360-7.
153. Görzer I, Jaksch P, Strassl R, Klepetko W, Puchhammer-Stöckl E. Association between plasma Torque teno virus level and chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2017; **36**(3): 366-8.
154. Strassl R, Doberer K, Rasoul-Rockenschaub S, et al. Torque Teno Virus for Risk Stratification of Acute Biopsy-Proven Alloreactivity in Kidney Transplant Recipients. *J Infect Dis* 2019; **219**(12): 1934-9.
155. Wohlfarth P, Leiner M, Schoergenhofer C, et al. Torquetenovirus Dynamics and Immune Marker Properties in Patients Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Prospective Longitudinal Study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2018; **24**(1): 194-9.
156. Pradier A, Masouridi-Levrat S, Bosshard C, et al. Torque Teno Virus as a Potential Biomarker for Complications and Survival After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol* 2020; **11**: 998-.
157. Cantoni N, Hirsch HH, Khanna N, et al. Evidence for a bidirectional relationship between cytomegalovirus replication and acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; **16**(9): 1309-14.
158. Maggi F, Focosi D, Albani M, et al. Role of Hematopoietic Cells in the Maintenance of Chronic Human Torquetenovirus Plasma Viremia. *Journal of Virology* 2010; **84**(13): 6891.
159. Schmitz J, Kobbe G, Kondakci M, Schuler E, Magorsch M, Adams O. The Value of Torque Teno Virus (TTV) as a Marker for the Degree of Immunosuppression in Adult Patients after Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT). *Biol Blood Marrow Transplant* 2020; **26**(4): 643-50.
160. Euser AM, Zoccali C, Jager KJ, Dekker FW. Cohort studies: prospective versus retrospective. *Nephron Clin Pract* 2009; **113**(3): c214-7.

## 6 Anhang

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des TTV-Genoms (Isolat TA278)..... 22