

Aus dem Institut für Virologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Timm

**Quantitative Bestimmung des Torque Teno Virus als  
Marker für den Grad der Immunsuppression bei Patienten  
vor und nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Julia Christina Schmitz  
2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Ortwin Adams

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Guido Kobbe

*Für meine wundervolle Familie*

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

JULIA SCHMITZ, GUIDO KOBBE, MUSTAFA KONDAKCI,  
ESTHER SCHULER, MAX MAGORSCH, ORTWIN ADAMS:  
**The value of Torque Teno Virus (TTV) as a marker  
for the degree of immunosuppression in adult patients  
after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT)**  
Journalartikel in *Biol Blood Marrow Transplant* 26 (2020), 643-650  
<https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2019.11.002>

# Zusammenfassung

Das Torque-Teno-Virus (TTV) ist ein nicht umhülltes, einzelsträngiges und zirkuläres DNA-Virus ohne bislang bekannten Krankheitswert. TTV hat weltweit eine hohe Prävalenz und verursacht eine jahre- oder lebenslang bestehende Virämie, wobei die individuelle Viruslast eines gesunden Menschen zwischen  $10^2$  und  $10^8$  Kopien/ml Plasma variieren kann. Ein Zusammenhang zwischen der nachweisbaren TT-Viruslast und dem Ausmaß einer bestehenden Immundefizienz wird vermutet, da unter anderem bei Patienten nach Einzelorgantransplantation Spitzenwerte der TTV-Replikation beobachtet werden konnten.

Ziel unserer Untersuchungen war es, zu klären, inwieweit die TT-Viruslast den aktuellen Immunstatus bei allogenen stammzelltransplantierten Patienten widerspiegelt und als prognostischer Marker für klinisch relevante Ereignisse wie eine Virusreaktivierung, eine akute *graft versus host disease* (GvHD), ein drohendes Rezidiv oder einen tödlichen Ausgang dienen kann.

Im Rahmen einer retrospektiven Studie wurden 2054 tiefgefrorene, eluierte Vollblutproben von 123 allogenen Stammzelltransplantierten in definierten Zeiträumen vor und nach Transplantation auf das Vorhandensein von TTV-DNA mittels Echtzeit-(Real Time) PCR getestet. Mit einem zeitlichen Abstand von 15-20 Tagen zwischen den untersuchten Proben galt es, einen Beobachtungszeitraum von insgesamt 300 Tagen nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) abzudecken.

Die Untersuchungen ergaben folgende signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ): Patienten mit lymphatischer Neoplasie zeigten nach HSCT eine höhere TT-Viruslast als Patienten mit einer myeloischen Neoplasie. Patienten mit einer vorausgegangenen vollständigen Remission vor HSCT wiesen im weiteren Verlauf nach HSCT höhere TT-Viruslasten auf als Patienten mit einer aktiven Erkrankung vor HSCT. Patienten mit einem myeloablativen Konditionierungsregime entwickelten nach HSCT eine höhere TT-Viruslast als Patienten mit einem intensitätsreduzierten Konditionierungsregime. Die TT-Viruslast der Patienten mit einer Anti-Thymozyten-Globulin (ATG)-Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht lag höher als die der Patienten mit einer niedrigeren ATG-Dosis. Patienten mit einem übereinstimmenden CMV-IgG-Serostatus von Spender und Empfänger präsentierten eine geringere TT-Viruslast als Patienten, bei denen er nicht übereinstimmte. Patienten mit bestehender TTV-Detektion vor HSCT hatten nach HSCT eine höhere TT-Viruslast als Patienten ohne TTV-Detektion vor HSCT. Es gab andererseits keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne klinisch relevanter CMV-, EBV-, BK-, HSV1- oder HHV6-Reaktivierung, zwischen Patienten mit und ohne GvHD, zwischen Patienten mit und ohne Rezidiv und auch zwischen Patienten, die starben und denjenigen, die überlebten. Darüber hinaus zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der TT-Viruslast in Abhängigkeit von der Tacrolimus- und Cyclosporin-A-Konzentrationen im Blut der Patienten. Die TT-Viruslast korrelierte nicht mit der T-Zellzahl, der T-Suppressorzellzahl, der T-Helferzellzahl, der NK-Zellzahl und der B-Zellzahl.

Wir konnten zeigen, dass die TT-Viruslast bei Patienten vor und nach HSCT multifaktoriell beeinflusst wird, dass die Faktoren untereinander korrelieren und sich gegenseitig beeinflussen. Weiterhin hat sich das Auftreten klinisch relevanter Ereignisse nicht in einer signifikant veränderten TT-Viruslast in unserer Kohorte niedergeschlagen. Daher kann unseren Ergebnissen entsprechend TTV nicht als sicherer Marker für den Grad der Immunsuppression oder als prognostischer Marker für die mögliche Vorhersage einer Virusreaktivierung, einer GvHD, eines Rezidivs und für einen letalen Ausgang verwendet werden.

## Summary

The Torque-Teno-Virus (TTV) is a non-encapsulated, single-stranded, circular DNA virus without any known disease value. TTV has a high prevalence worldwide and causes a year- or life-long viremia, whereby the individual viral load of a healthy person varies greatly between  $10^2$  and  $10^8$  copies/ml plasma. A relation between the detectable TT viral load and the extent of preexisting immunodeficiency is suspected. For example, peak values of TT viral load could be observed in patients with single organ transplantation.

The aim of our investigations was to gain insight into the clinical significance of TT viral load determination in the blood of allogeneic stem cell transplanted patients by asking two questions: can TTV reflect the current immune status of patients and can TTV predict clinically relevant events such as virus reactivation, acute graft versus host disease (GvHD), imminent relapse or potential death?

In the context of a retrospective study, 2054 frozen, eluted whole blood samples of 123 allogeneic stem cell transplanted patients were randomly tested for the presence of TTV DNA by real-time PCR. With a time interval of 15-20 days between the samples examined, we covered an observation period of 300 days after haematopoietic stem cell transplantation (HSCT).

The analyses revealed the following significant differences ( $p < 0.05$ ): Patients with lymphatic neoplasia had higher TT viral loads after HSCT than patients with myeloid neoplasia. Patients with previous complete remission before HSCT showed higher TT viral loads after HSCT than patients with active disease prior to HSCT. Patients with myeloablative conditioning regimes developed higher TT viral loads after HSCT than patients with intensity-reduced conditioning regimes. The TT viral load of patients with an anti-thymocyte globulin (ATG) dose of 20 mg/kg body weight was higher than those with a lower ATG dose. Patients with a matching CMV-IgG serostatus demonstrated lower TT viral loads than patients in whom CMV-IgG serostatus of donor and recipients did not agree. Patients with existing TTV detection before HSCT presented higher TT viral loads after HSCT than patients without TTV detection before HSCT. In contrast, there were no significant differences between patients with and without clinically relevant CMV-, EBV-, BK-, HSV1-, or HHV6-reactivation, between patients with or without GvHD, between patients with and without relapse and also between patients who died and those who survived. Furthermore, no significant differences in TT viral load were found depending on the Tacrolimus and Cyclosporine A concentrations in the blood of the patients. The TTV load after HSCT did not correlate with T-cell, T-suppressor cell, T-helper cell, NK- and B cell count.

We were able to show that TT viral load in patients before and after HSCT is influenced by a wide variety of factors. In addition, we were able to demonstrate that the factors correlate and influence each other. Furthermore, the occurrence of clinically relevant events was not reflected in any significant TT viral load in our cohort. Therefore, TTV cannot be used as a marker for the degree of immunosuppression nor as a prognostic marker for a possible prediction of virus reactivation, GvHD, relapse, and finally, even death.

# Abkürzungen

<b>AE</b>	aktive Erkrankung
<b>aGvHD</b>	akute <i>Graft versus Host Disease</i>
<b>ALL</b>	akute lymphatische Leukämie
<b>AML</b>	akute myeloische Leukämie
<b>ATG</b>	Anti-Thymozyten-Globulin
<b>AUC</b>	<i>Area under the curve</i>
<b>cGvHD</b>	chronische <i>Graft versus Host Disease</i>
<b>CLL</b>	chronische lymphatische Leukämie
<b>CMV</b>	humanes Cytomegalievirus
<b>CRESS-DNA Viren</b>	zirkuläre Replikationsinitiator-Protein kodierende einzelsträngige DNA Viren
<b>CSA</b>	Cyclosporin A
<b>E</b>	Empfänger
<b>EBV</b>	Epstein-Barr-Virus
<b>GvHD</b>	<i>Graft versus Host Disease</i>
<b>HHV6</b>	Humanes Herpesvirus Typ 6
<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienz-Virus
<b>HLA</b>	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
<b>HSCT</b>	hämatopoetische Stammzelltransplantation
<b>HSV1</b>	Herpes Simplex Virus Typ 1
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>KR</b>	Komplettremission
<b>MAC</b>	Myeloablative Konditionierungstherapie
<b>MDS</b>	Myelodysplastisches Syndrom
<b>miRNA</b>	MicroRNA
<b>MM</b>	multiples Myelom
<b>MMF</b>	Mycophenolat-Mofetil
<b>NHL</b>	Non-Hodgkin Lymphom
<b>NT</b>	Nukleotide

---

<b>OMF/PMF</b>	primäre Osteomyelofibrose
<b>PBMC</b>	periphere mononukleäre Blutzellen
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>RIC</b>	Intensitätsreduzierte Konditionierungstherapie
<b>S</b>	Spender
<b>SZT</b>	Stammzelltransplantation
<b>T-PLL</b>	T-Zell-Promlymphozytenleukämie
<b>TTMDV</b>	Torque-Teno-Midi-Virus
<b>TTMV</b>	Torque-Teno-Mini-Virus
<b>TTV</b>	Torque-Teno-Virus
<b>UTR</b>	unübersetzte Region



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Taxonomische Einordnung . . . . .	1
1.2	Aufbau des Virus . . . . .	1
1.3	Geschichte, Krankheitswert und Infektionsweg . . . . .	2
1.4	TTV und das Immunsystem . . . . .	3
1.5	Zielsetzung der Arbeit . . . . .	5
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>7</b>
2.1	Zusammensetzung Patientenkollektiv . . . . .	7
2.2	Probenauswahl . . . . .	10
2.3	Probenaufarbeitung und Amplifikation mittels PCR . . . . .	10
2.4	Polymerase-Ketten-Reaktion . . . . .	12
2.5	Statistische Auswertung . . . . .	13
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>16</b>
3.1	TT-Viruslast Gesamtkollektiv . . . . .	16
3.2	TT-Viruslast in Abhängigkeit von dem Geschlecht . . . . .	17
3.3	TT-Viruslast in Abhängigkeit von der Grunderkrankung . . . . .	17
3.4	TT-Viruslast in Abhängigkeit von dem Remissionsstatus vor HSCT . . . . .	19
3.5	TT-Viruslast in Abhängigkeit von der Konditionierungstherapie . . . . .	22
3.6	TT-Viruslast in Abhängigkeit von der ATG Dosierung . . . . .	23
3.7	TT-Viruslast in Abhängigkeit von der GvHD-Prophylaxe . . . . .	26
3.8	TT-Viruslast in Abhängigkeit von dem Sender und Empfänger CMV-Serostatus . . . . .	27
3.9	TT-Viruslast in Abhängigkeit von dem Verwandtschaftsgrad zwischen Spender und Empfänger . . . . .	28
3.10	TT-Viruslast in Abhängigkeit von einem TTV-Nachweis vor HSCT . . . . .	29
3.11	TT-Viruslast in Abhängigkeit von aufgetretenen Virusreaktivierungen . . . . .	32
3.12	TT-Viruslast in Abhängigkeit von Virusreaktivierungen $\geq 1000$ Kopien/ml . . . . .	34
3.13	TT-Viruslast in Abhängigkeit von aufgetretenen Abstoßungsreaktionen . . . . .	36
3.14	TT-Viruslast in Abhängigkeit von dem Auftreten eines Rezidivs . . . . .	39
3.15	TT-Viruslast in Abhängigkeit von früheren Stammzelltransplantationen . . . . .	40
3.16	TT-Viruslast in Abhängigkeit von dem Ausgang . . . . .	42
3.17	TT-Viruslast in Abhängigkeit von der GvHD-Prophylaxe (myeloisch Erkrankte) . . . . .	48
3.18	TT-Viruslast in Abhängigkeit von der ATG Dosierung (myeloisch Erkrankte) . . . . .	51
3.19	TT-Viruslast in Abhängigkeit von dem Auftreten einer aGvHD (myeloisch Erkrankte) . . . . .	53
3.20	TT-Viruslast in Abhängigkeit von der Behandlung einer aGvHD (myeloisch Erkrankte) . . . . .	54
3.21	TT-Viruslast in Abhängigkeit von dem Auftreten eines Rezidivs (myeloisch Erkrankte) . . . . .	55

3.22	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman . . . . .	58
3.23	Untersuchung der Korrelationen zwischen den Einflussfaktoren . . . . .	60
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>65</b>
4.1	Einflussfaktoren auf die Höhe der TT-Viruslast . . . . .	67
4.2	TTV als Biomarker . . . . .	69
4.3	Fazit . . . . .	71
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>73</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Taxonomische Einordnung

Das Torque-Teno-Virus (kurz TTV von *torques* und *tenuis*, lateinisch für „Halskette“ und „dünn“) gehört zur Familie der Anelloviren (von *anellus*, lateinisch für „Ring“, was auf das kreisförmige Genom zurückzuführen ist) [1]. Neben anderen, zirkulären, Replikationsinitiator-Protein kodierenden, einzelsträngigen DNA (*circular replication associated protein (Rep)-encoding single stranded DNA viruses* = CRESS-DNA) Viren [2] machen die Anelloviren mit ca. 70% den größten Anteil am menschlichen Blut Virom aus [3, 4].

Lange Zeit galten die CRESS-DNA Viren als Krankheitserreger, die ausschließlich Pflanzen und Tiere infizieren, aber in den letzten Jahren konnten sie auch in einer Vielzahl von wirbellosen Tieren und Wirbeltieren und letztlich auch dem Menschen nachgewiesen werden [5, 6]. Ob und welchen Krankheitswert CRESS-DNA Viren im menschlichen Körper besitzen, ist bislang unbekannt [7]. CRESS-DNA Viren zeichnen sich durch die kleinsten Genome autonom replizierender eukaryotischer Viren [8] mit wenigen proteinkodierenden Genen bei gleichzeitig bestehender großer genetischer Vielfalt aus und gehören verschiedenen Virusfamilien an [7]. Zu denen im Menschen vorkommenden CRESS-DNA Viren zählen neben dem Anellovirus das Circo- [9], Cyclo- [10], Gemycircular- [11], Gyro- [12], Smaco- [13] und Pecovirus [13].

Die Familie der Anelloviren ist untergliedert in neun Gattungen, die menschliche und tierische Torque-Teno-Viren umfassen [14–16]. Die Vielfalt der Anelloviren lässt sich in der Nukleotidsequenz, der genomischen Größe und Organisation, den tierischen Wirten und in einer Reihe von intragenomisch neu angeordneten subviralen Molekülen bestimmter TT-Virustypen erkennen [17–19]. So ist es möglich, innerhalb der Gattung Alpha-Torque-Teno-Virus 29 Hauptarten des Torque-Teno-Virus genetisch zu klassifizieren, die wiederum aus zahlreichen Stämmen bestehen [15]. Im Jahr 2000 gelang der Nachweis des Torque-Teno-Mini-Virus (TTMV) [20] und 2007 folgte das Torque-Teno-Midi-Virus (TTMDV) [21], der Gattungen Beta-Torque-Teno-Virus und Gamma-Torque-Teno-Virus, die sich durch kleinere Genome als die TTV-Prototypenstämme auszeichneten [22].

## 1.2 Aufbau des Virus

Anelloviren, so auch das Torque-Teno-Virus, sind nicht umhüllte, einzelsträngige, zirkuläre DNA-Viren mit Genomgrößen von 2,0 bis 3,9 kb – 3,6-3,9 kb für TTV [23–25] 3,24-3,25 kb für TTMDV [26] und 2,86-2,91 kb für TTMV [27]. Sein Genom umfasst mindestens vier offene Leserahmen, wobei ORF 1 eine hypervariable Region aufweist [28] und einen nicht kodierenden GC-reichen

Abschnitt, der als vermeintlicher Replikationsursprung gilt. Die Verschiedenartigkeit der Sequenzen variiert innerhalb des Genoms [29]. So verfügt die unübersetzte Region (*untranslated region*=UTR) über mehrere hochkonservierte Bereiche, die eine 90% ige Übereinstimmung verschiedener Isolate anzeigt [30]. Dem gegenüber steht die übersetzte Region mit einem ausgeprägten Maß an Vielfalt [31, 32].

Aktiviert periphere mononukleäre Blutzellen (*peripheral blood mononuclear cell*= PBMC) wurden zunächst als die bedeutsamsten replikationskompetenten Zellen des TTVs angesehen [33–35]. Heutzutage ist davon auszugehen, dass das Torque-Teno-Virus überwiegend in den T-Lymphozyten repliziert wird [36, 37]. Eine Zellkultivierung des TTVs gelang bislang nicht, auch wenn das zugehörige TTMV auf einer Zelllinie des Atemwegsepithels (A549-Zellen) angezüchtet werden konnte [38].

### 1.3 Geschichte, Krankheitswert und Infektionsweg

TTV DNA wurde 1997 erstmalig im Serum von drei Patienten mit erhöhten Leberwerten nach Erhalt von Bluttransfusionen nachgewiesen [39–41], sodass man auf Grundlage dieser Beobachtung davon ausging, dass TTV die Fähigkeit zur Auslösung einer Posttransfusions Non-A bis G Hepatitis besitze. Auch wurde TTV in Verbindung mit Atemwegserkrankungen [42, 43], malignen [44–46], hämatologischen [47, 48] und autoimmunologischen Erkrankungen gebracht [49–52]. Stand der aktuellen Forschung ist allerdings bislang, dass sich dem Torque-Teno-Virus kein spezifisches Krankheitsbild zuordnen lässt [53–56].

Aufgrund einer erhöhten Prävalenz von TTV-Infizierten unter denen mit Blut in Kontakt geratenen oder mit Blutprodukten behandelten Patienten ergab sich der Verdacht, dass es sich um ein durch Blut übertragbares Virus handelt, weshalb man diesem Virus den Namen *transfusion-transmitted virus*, kurz TTV, zuteil werden ließ [57]. Da dem überwiegenden Anteil aller TTV-Infizierten allerdings keine Bluttransfusionen verabreicht worden waren, zog man weitere Übertragungswege in Betracht. Der Erwerb des Virus durch Blutkontakt ließ auf eine mögliche parenterale Übertragung schließen [58]. Daneben gelang es, TTV-DNA im Speichel [59], in Rachenabstrichen [60], in der Muttermilch [61], in Sperma [62], in der Vaginalflüssigkeit [63] und im Stuhl TTV Infizierter [64] zu detektieren. Auch wird ein plazentarer Transfer des TTV beschrieben [65].

Zum jetzigen Zeitpunkt geht man davon aus, dass ein TTV Erstkontakt schon innerhalb der frühen Kindheit [66] über die Aufnahme der Muttermilch, den Kontakt mit Speichel oder anderen Körperflüssigkeiten erfolgt und sich im weiteren Verlauf Infektionen mit anderen TTV Stämmen über einen fäkal-oralen, respiratorischen und/oder sexuellen Weg anschließen [67]. Einmal erworben ruft TTV eine jahre- oder lebenslang bestehende Virämie hervor [43, 55, 56].

## 1.4 TTV und das Immunsystem

Das Torque-Teno-Virus besitzt mit einer bis zu 95% igen Durchseuchung der Bevölkerung weltweit eine hohe Prävalenz und etwa 70-90 % der gesunden Population sind Träger dieses Virus [68]. Dabei scheint das Vorkommen des TTV unabhängig von Alter, sozioökonomischem Status und der gesundheitlichen Verfassung des jeweils Infizierten zu sein [7]. Die individuelle Viruslast eines gesunden Menschen variiert sehr stark und liegt etwa zwischen  $10^2$  und  $10^8$  Kopien/mL Plasma [69] und wird beeinflusst durch Alter, Geschlecht und der Seropositivität gegenüber des Cytomegalievirus (CMV) [70]. Dabei weisen junge Frauen (20 bis 30 Jahre) im Vergleich zu Gleichaltrigen männlichen Geschlechts, aber auch zu älteren Frauen wie Männern die niedrigsten Viruslasten auf. Die größte Viruslast lässt sich bei Männern fortgeschrittenen Alters (>80 Jahre) finden. CMV IgG seropositive Patienten zeigen erhöhte Viruslasten im Vergleich zu den CMV Seronegativen. Allerdings lässt sich dieser Unterschied nur bei jungen (20 bis 30 Jahre) und mittelalten (50 bis 60 Jahre) Menschen dokumentieren [70].

Bislang konnte nicht abschließend geklärt werden, ob einige der Untersuchten das Torque-Teno-Virus tatsächlich nicht im Körper tragen oder eine TTV-negative Probe auf die mangelnde Sensitivität der verwendeten Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und/oder auf ein temporäres Ausbleiben der TTV-Replikation zurückzuführen ist [7]. Es konnte gezeigt werden, dass die zu einem bestimmten Zeitpunkt gemessene Torque-Teno-Viruslast Ausdruck einer höchst dynamischen Entwicklung ist, die das Zusammenspiel von Virusreplikation und antiviraler Immunantwort widerspiegelt. So werden täglich schätzungsweise mindestens  $3,8 \cdot 10^{10}$  Virionen freigesetzt – bei einer gleichzeitig von statten gehenden Bereinigung (*Clearance*) des Plasmas von etwa 90 % der Virionen [71]. Ähnlich verhält es sich bei dem Hepatitis C-, dem Humanen Immundefizienz- und dem Hepatitis B-Virus, die sich ebenfalls als hochdynamische chronische Infektionen erwiesen haben [72, 73].

TTV bewirkt eine Stimulation der humoralen und angeborenen Immunreaktion und beeinflusst die Zytokinproduktion und -sekretion [74, 75]. Dabei scheint TTV über die Nutzung viraler MicroRNAs (miRNAs) *in vivo* in der Lage zu sein, die angeborene Immunantwort zu modulieren und seine Persistenz zu fördern [76]. MicroRNAs sind kurze (ca. 21-23 Nukleotide), hoch konservierte, nicht kodierende RNAs, die die posttranskriptionelle Genregulation in vielen Eukaryonten und Viren steuern [77, 78]. Im Gegensatz zu den meisten proteinbasierten viralen Genprodukten gelten virale miRNAs als vergleichsweise unsichtbar für das Immunsystem [77]. Den viralen miRNAs wird eine Einflussnahme im Bereich der Immunabwehr, der Verlängerung der Lebensspanne von Wirtszellen und der Regulation chronischer versus aktiver Infektionen [79, 80] zugesprochen. Die durch TTV kodierten miRNAs sind auf N-myc (und STAT) Interaktor gerichtet, das als Modulator der Interferon- und Zytokinsignalwirkung bekannt ist [81]. Dadurch wird die Reaktion auf Interferone gestört und es kommt gleichzeitig zu einer Steigerung der Zellproliferation in Gegenwart von Interferon [76]. Indem sich TTV der Erkennung durch das

Immunsystem entzieht und eine antivirale Reaktion des Wirtes bekämpft, ist eine Vermehrung dieser Viren im Wirt möglich [7].

Es wird angenommen, dass ein Zusammenhang zwischen der aktuell gemessenen TTV-Virämie und dem Ausmaß der vorliegenden Immunschwäche vorliegt. Dies scheint unabhängig davon zu sein, ob die Immundefizienz angeboren [82] oder iatrogen erworben [83, 84] ist. So konnten Spitzenwerte der TTV-Replikation bei Patienten mit Sepsis [85], mit zu Grunde liegender Humanen Immundefizienz-Virus (HIV)-Infektion [86–88] und bei Patienten mit unbehandelter maligner Erkrankung [89] beobachtet werden. Auch Patienten mit autologer [84] und allogener [90, 91] hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) zeigten ebenso wie Patienten mit Einzelorgantransplantation [92–95] einen deutlichen Anstieg der Torque-Teno-Viruslast.

Untersuchungen bei Patienten mit Einzelorgantransplantation sollten Erkenntnisse liefern, ob und inwieweit die Bestimmung der Torque-Teno-Viruslast im klinischen Alltag von Nutzen sein könnte. Ziel war es, eine untere und obere Schwelle der TTV-Virämie zu identifizieren, die zwischen zu hoher und unzureichender immunsuppressiver Therapie unterscheiden würde. Komplikationen – wie durch zu starke immunsuppressive Therapie hervorgerufene opportunistische Infektionen oder akute Abstoßungsreaktionen, die mit einer unzureichenden immunsuppressiven Therapie begründet sind – würden nur noch eine untergeordnete Rolle spielen [3, 76, 84]. Tatsächlich konnte bei Patienten mit anhaltender Immunsuppression nach Einzelorgantransplantation gezeigt werden, dass hohe Plasma Torque-Teno-Viruslasten zu einer erhöhten Gefahr viraler Infektionen, aber zu einer verringerten Gefahr für T- oder B-Zell vermittelte Abstoßungsreaktionen führen [3, 92–97]. Görzer *et al.* konnten bei einem Kollektiv von 31 Lungentransplantierten einen Schwellenwert von  $9,3 \log_{10}$  DNA-Kopien TTV pro Milliliter Plasma detektieren, dessen Überschreiten prädiktiv für die Entwicklung opportunistischer Infektionen war [95]. Damit käme dem TTV eine wichtige Rolle als Marker der funktionellen Immunkompetenz zu, die definiert ist als die Fähigkeit, eine schützende Immunantwort gegen eine antigene Stimulation einzuleiten [7].

Änderungen der CD8+57+ T-Lymphozytenexpansionen nach autologer hämatopoetischer Stammzelltransplantation korrelierten in den Beobachtungen von Maggi und Focosi in umgekehrter Weise mit den Veränderungen der Torque-Teno-Virämie [83, 84, 98]. Überdies postulierten selbige Autoren, dass ein Rückgang der TT-Viruslast zu den anfänglichen Werten vor autologer HSCT ein Anhaltspunkt für die erforderliche Zeitspanne darstellen könnte, die ein Patient benötigte, um die erforderliche Immunkompetenz für den nächsten Chemotherapie-Durchlauf wiederherzustellen [83].

Untersuchungen bei allogenen stammzelltransplantierten Patienten deuteten darauf hin, dass die Plasma-TTV-DNA-Last durch die Konditionierung drastisch abnimmt und dass sie nach der Transplantation mit einer Zunahme der absoluten Lymphozytenzellzahlen wieder an Größe zunimmt [99, 100]. Albert *et al.* beschrieben, dass die Fläche unter der Kurve der Plasma-TTV-

DNA-Lasten zwischen Tag +20 und +30 nach allogener HSCT zur Abschätzung des Risikos einer hochgradigen CMV-Virämie dienen könnte [101]. Bislang wurden bereits einige Einflussfaktoren identifiziert, die die Torque-Teno Viruslast nach HSCT beeinflussen. So hat sich gezeigt, dass unter klinischen Bedingungen therapeutische Mittel wie Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) [37] oder die Art der zugrunde liegenden Malignität [99] die TTV-Belastung beeinflussen können, was zu einer Relativierung der Interpretation führt.

Infektionen und Rezidive sind bei Patienten mit HSCT eng mit der Immunabwehrkompetenz nach Spendertransplantation verknüpft [99]. Daher wäre es auch in diesem Patientenkollektiv denkbar, dass die TTV Belastung des Wirtes Aufschluss über den aktuellen Immunstatus gibt und als ein Marker zur Einschätzung des Risikos von Komplikationen und einer *Graft versus Host Disease* (GvHD) genutzt werden könnte. Eine wichtige Voraussetzung als potentieller Marker bringt TTV mit sich: es zeigt sich unempfindlich gegenüber antiviralen Medikamenten, wodurch eine mögliche Einschränkung des viralen Markers – insbesondere bei Immunsupprimierten – aufgehoben wird [3].

Eine fein justierte Anpassung der immunsuppressiven Therapie wurde bislang noch weitestgehend von klinischer Intuition, Erfahrung und anderen labormedizinischen Parametern, aber weniger von objektivierbaren messbaren Parametern geleitet [102]. Eine konsequente Bestimmung der Torque-Teno-Viruslast im Blut der Patienten könnte das bislang primär auf dem Plasmaspiegel des Wirkstoffs basierende Anpassungsverfahren der immunsuppressiven Therapie ersetzen [7].

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll Aufschluss geben über die klinische Bedeutung der im Blut hämatopoetisch stammzelltransplantierte Patienten bestimmbarer Torque-Teno Viruslast. Dabei galt es zu beurteilen, ob die Torque-Teno Viruslast den aktuellen Immunstatus des Patienten verlässlich widerspiegelt und zur Beurteilung des Grades der medikamentös induzierten Immunsuppression herangezogen werden kann. Ferner sollten verschiedene Lymphozytensubpopulationen auf eine bestehende Korrelation mit dem TT-Virus hin untersucht und die TT-Viruslast in Abhängigkeit von den verwendeten Immunsuppressiva in unterschiedlicher Dosierung verglichen werden. Weiterhin sollte erfasst werden, ob eine regelmäßige Kontrolle der bestehenden TT-Virusbelastung im Körper der Patienten dabei helfen kann, klinisch entscheidende Endpunkte wie die Entwicklung einer Cytomegalievirus (CMV)- und/oder Epstein-Barr-Virus (EBV)-Reaktivierung, einer akuten oder chronischen *Graft versus Host Disease* (GvHD), eines Rezidivs oder ein potentiell drohendes Versterben verlässlich vorherzusagen. Ziel der Arbeit sollte es überdies sein, Erkenntnisse darüber zu erlangen, ob die Torque-Teno-Viruslast mit demographischen

Daten (Geschlecht und Alter), mit der hämatoonkologischen Ursache für eine HSCT (myeloische vs lymphatische Neoplasie), mit dem Remissionsstatus des Patienten vor HSCT, sowie dem CMV Status und dem Verwandtschaftsgrad von Spender und Empfänger korreliert. Die Frage, ob und inwieweit eine bestehende Trägerschaft des Torque-Teno-Virus bereits im Vorfeld der HSCT Bedeutung für die Entwicklung der Viruslast nach Transplantation hat, sollte auch behandelt werden.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zusammensetzung Patientenkollektiv

Im Rahmen einer retrospektiven Untersuchung wurden 2054 Proben aus dem Zeitraum von September 2015 bis April 2018 aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf auf das Vorhandensein von Torque-Teno-Virus DNA mittels *Realtime*-PCR getestet. Dabei wurden Vollblut-Proben von 123 allogenen stammzell-transplantierten Patienten untersucht, die im genannten Zeitraum an das Institut für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf geschickt worden waren. Aus den Proben waren bereits im Rahmen des klinischen Routine-Screenings nach HSCT virale Parameter – vornehmlich die Viruslast des Cytomegalievirus (CMV) und des Epstein-Barr-Virus (EBV) – bestimmt worden. Im Anschluss daran wurden die Proben im Tiefkühl-Archiv des Instituts für Virologie bei minus 20 Grad Celsius tiefgefroren eingelagert.

Die demographischen und klinischen Merkmale des untersuchten Patientenkollektivs sind in Tabelle 1 aufgelistet. Wie Tabelle 1 dabei unter anderem zu entnehmen ist, stammten die Proben von 74 männlichen und 49 weiblichen Patienten. Das Alter der männlichen Patienten betrug im Median 56,3 Jahre (Spanne 18,7 – 74,5 Jahre), das Alter der weiblichen Patienten 52,6 Jahre (Spanne 23,5 – 69 Jahre). 58 Patienten waren an einer akuten myeloischen Leukämie (AML) erkrankt, 33 Patienten an einem myelodysplastischem Syndrom (MDS), 11 Patienten an einem Non-Hodgkin-Lymphom (NHL), 9 Patienten an einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL), 3 Patienten an einem multiplem Myelom (MM), 3 Patienten an einer primären Osteomyelofibrose (OMF/PMF), 2 Patienten an einer sekundären Osteomyelofibrose, 1 Patient an einer chronisch lymphatischen Leukämie (CLL), 1 Patient an einer T-Prolymphozytenleukämie (T-PLL), 1 Patient an einer aplastischen Anämie und 1 Patient an einer diffusen systemischen Sklerodermie. Von den Patienten mit AML waren 29 männlich und 29 weiblich und das Alter in dieser Erkrankungsgruppe lag im Median bei 53,3 Jahren. Unter den Patienten mit MDS befanden sich 22 männliche und elf weibliche Patienten, deren Alter im Median 58,8 Jahre betrug. Acht männliche und drei weibliche Patienten bildeten das Kollektiv der unter einem NHL leidenden Patienten. Hier betrug das Alter im Median 51,2 Jahre. Bei den Patienten mit MM zeigten sich drei männliche Patienten mit einem Median Alter von 62,7 Jahren. Die Gruppe der an OMF/PMF erkrankten Patienten bestand aus zwei männlichen und einer weiblichen Patientin. Das Alter innerhalb dieser Gruppe lag im Median bei 60,1 Jahren. Zwei Patientinnen mit sekundärer Osteomyelofibrose wiesen ein Alter im Median von 55,1 Jahren auf. Hinzu kamen noch eine 32-jährige Patientin mit aplastischer Anämie, ein 50-jähriger Patient mit T-PLL, ein 53-jähriger CLL Patient und eine 24-jährige Patientin mit diffuser systemischer Sklerodermie.

Alle Patienten erhielten entweder eine myeloablative Konditionierungstherapie (MAC) oder eine Konditionierungstherapie mit reduzierter Intensität (RIC). Bei der MAC-Therapie wurden

	alle Patienten (n=123)
<b>Geschlecht, n (%)</b>	
Männlich	74 (60,2)
Weiblich	49 (39,8)
<b>Mittleres Alter (Jahre und (Spanne))</b>	54 (19-75)
<b>Zugrundeliegende Erkrankung, n (%)</b>	
Akute myeloische Leukämie	58 (47,2)
Akute lymphatische Leukämie	9 (7,3)
Myelodysplastisches Syndrom	33 (26,8)
Non-Hodgkin Lymphome	11 (8,9)
Andere	12 (9,8)
<b>Vorausgegangene Chemotherapie Zyklen, n (Median) (Spanne)</b>	3 (0-17)
<b>Zeit seit Diagnosestellung, Monate (Median) (Spanne)</b>	4 (1-37)
<b>Remissionsstatus zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, n(%)</b>	
Vollständige/partielle Remission	59 (47,9)
Aktive Erkrankung (Progress/Rückfall)	64 (52,0)
<b>Konditionierungsregime, n (%)</b>	
Myeloablativ	48 (39,0)
Reduzierte Intensität	75 (60,9)
<b>Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) (n)</b>	87 (70,7)
<b>Graf versus Host Disease (GvHD) Prophylaxe, n (%)</b>	
Mycophenolat-Mofetil + Cyclosporin A	30 (24,4)
Mycophenolat-Mofetil + Tacrolimus	83 (67,5)
<b>Stammzellquelle, n(%)</b>	
Periphere Blutstammzellen	116 (94,3)
Knochenmark	7 (5,7)
<b>Transplantatcharakteristika, n(%)</b>	
Nicht verwandter Spender	90 (73,2)
Verwandter Spender	33 (26,8)
Passend (10 von 10)	105 (85,4)
Fehlangepasst (9 von 10)	18 (14,6)
<b>Cytomegalievirus (CMV)-Serostatus von Spender und Empfänger, n (%)</b>	
Spender + / Empfänger +	67 (54,5)
Spender + / Empfänger -	11 (8,9)
Spender - / Empfänger +	12 (9,8)
Spender - / Empfänger -	33 (26,8)
<b>Todesfälle im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen, n (%)</b>	11 (8,9)
<b>Rezidivfälle im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen, n(%)</b>	45 (36,5)
<b>Nichtauftreten einer GvHD im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen, n(%)</b>	50 (40,7)
<b>Auftreten einer akuten GvHD im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen, n(%)</b>	73 (59,3)
Akute GvHD $\geq$ Grad 2	32 (26,0)
<b>Auftreten einer chronischen GvHD, n(%)</b>	10 (8,1)
<b>Vorausgegangene autologe HSCT, n(%)</b>	8 (6,5)
<b>Vorausgegangene allogene HSCT, n(%)</b>	9 (7,3)

**Tabelle 1:** Charakteristika der in dieser Studie untersuchten 123 Patienten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT). „n“ beschreibt die Anzahl der Patienten mit Vorliegen eines bestimmten Merkmals.

alkylierende Verbindungen (Busulfan > 12 mg/kg Körpergewicht oder Melphalan 200 mg/m<sup>2</sup>) entweder allein oder zusammen mit einer Ganzkörperbestrahlung (> 8 TBI) verabreicht, was zu einer irreversiblen Zerstörung des Knochenmarks des Patienten führte. Eine Verringerung der Zytostatika- und Bestrahlungsintensität um mindestens 30 % wurde als RIC-Therapie definiert. Ziel der Konditionierung war es, eine wirksame Immunsuppression des Empfängers zu gewährleisten, um das *Engraftment* (Regeneration des blutbildenden Systems durch Anwachsen der übertragenen Stammzellen) nicht zu gefährden und ein primäres *Graft failure* (Transplantatversagen, das auf eine mögliche Abstoßung durch T-Zellen, NK-Zellen oder Antikörper zurückzuführen ist) abzuwenden. Überdies wurde eine Stammzellnische im Knochenmark erzeugt, um eine Ansiedlung der gespendeten Zellen zu ermöglichen. Nicht zuletzt wurde auch versucht, die antileukämische Wirkung der Spender-T-Zellen zu nutzen, um einen *Graft-versus-Leukemia*-Effekt zu erzielen. 48 der untersuchten 124 Patienten erfuhren eine MAC, die verbliebenen 75 Patienten wurden mit einer RIC behandelt. 87 der untersuchten 124 Patienten erhielten im Rahmen der Konditionierungstherapie ATG – 69 Patienten wurde eine Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht (KG) jeweils an den Tagen -3, -2 und -1 vor HSCT verabreicht, bei 18 Patienten lag die Dosierung bei 20 mg/kg KG jeweils an den Tagen -3, -2 und -1 vor HSCT.

Als Stammzellquelle dienten bei 116 der untersuchten 124 Patienten periphere Blutstammzellen, 7 Patienten erhielten Knochenmarksstammzellen. Bei 33 Patienten konnte auf einen Verwandten des Patienten als Stammzellquelle zurückgegriffen werden. 105 Patienten konnte ein *Human Leukocyte Antigen* (HLA)-passender (10 von 10) Spender zugeordnet werden. Bei 59 der untersuchten 124 Patienten lag zum Zeitpunkt der HSCT eine vollständige (n= 31) oder zumindest partielle Remission (n= 28) der Erkrankung vor. Aufgrund des sich bietenden Risikoprofils der zu Grunde liegenden Erkrankung folgte eine HSCT als einziges kuratives Therapiekonzept zur Erlangung einer anhaltenden Remission. Als *Graft versus host disease* (GvHD)-Prophylaxe wurde bei 30 Patienten eine Kombination aus Mycophenolat-Mofetil (MMF) und Cyclosporin A (CSA) gewählt, bei den übrigen 83 Patienten wurde MMF mit Tacrolimus supplementiert. Zur Erstbehandlung der akuten GvHD (aGvHD) erhielten Patienten Prednison in einer Tagesdosis von 2 mg/kg KG. Zur Zweitlinienbehandlung der GvHD wurden Etanercept, Basiliximab, extrakorporale Photophorese und Tyrosinkinase-Inhibitoren eingesetzt. Bezüglich des CMV-Serostatus ergab sich folgendes Bild: 67 Patienten zeigten bei Spender und Empfänger einen IgG positiven CMV-Serostatus. In 33 Fällen waren Spender und Empfänger beide CMV-IgG negativ. Bei 12 Transplantierten wies der Spender einen CMV-IgG negativen und der Empfänger einen CMV-IgG positiven Serostatus auf. 11 Patienten ließen das Bild eines CMV-IgG positiven Spenders und das eines CMV-IgG negativen Empfängers erkennen.

Es wurde untersucht, ob während des gesamten Beobachtungszeitraums zwischen Tag 0 und Tag 300 nach HSCT Virusreaktivierungen durch CMV und/oder EBV auftraten. Die Patientenbeobachtung beinhaltete eine Routineüberwachung nach HSCT mittels PCR. CMV- und EBV-Reaktivierungen wurden definiert als positive PCR-TT-Viruslasten über der Nachweisgrenze

der Methode (5,23 Kopien/Test für CMV und 7,25 Kopien/Test für EBV, 95 % Probit-Analyse) in einer oder mehreren Plasmaproben. Eine hochgradige CMV-DNAämie wurde eigenmächtig als  $\geq 1000$  Kopien/mL definiert, was häufig den Beginn einer präventiven antiviralen Therapie auslöste.

## 2.2 Probenauswahl

Insgesamt wurden 2054 Proben untersucht – 383 Proben davon wurden noch vor HSCT entnommen. Insgesamt wurden mindestens sieben und maximal 33 Proben pro Patient in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit auf das Vorhandensein des Torque-Teno-Virus getestet.

Entnommene Proben **vor** HSCT sollten Auskunft darüber geben, inwieweit ein TTV Kontakt bereits im Vorfeld der Stammzelltransplantation stattgefunden hatte. Dabei wurden Proben zwischen Tag 620 und Tag 1 vor HSCT untersucht, wenn man den Tag der HSCT als Tag 0 annimmt. Im Median wurde an Tag 25 und im Mittelwert an Tag 73 vor HSCT die Viruslast bestimmt. Die weit zurückliegenden Messzeitpunkte sind den Patienten zuzuordnen, die sich bereits im Vorfeld einer autologen (n= 8) oder allogenen (n= 9) HSCT unterzogen hatten, bei denen aber ein Rezidiv der zu Grunde liegenden Erkrankung eine erneute HSCT notwendig gemacht hatte. Bei diesen Patienten konnte auf eine Vielzahl an Vorwerten zurückgegriffen werden, womit sich auch die Spannweite an untersuchten Proben erklären lässt.

**Nach** durchgeführter HSCT wurden in den nachfolgenden 18 Zeiträumen Proben zur anschließenden quantitativen Viruslastbestimmung gewonnen. Insgesamt konnte ein Beobachtungszeitraum von 345 Tagen abgedeckt werden: Probe 1 (Tag 0 - 15), Probe 2 (Tag 16 - 30), Probe 3 (Tag 31 - 45), Probe 4 (Tag 46 - 60), Probe 5 (Tag 61 - 80), Probe 6 (Tag 81 - 99), Probe 7 (Tag 100 - 119), Probe 8 (Tag 120 - 140), Probe 9 (Tag 141 - 160), Probe 10 (Tag 161 - 180), Probe 11 (Tag 181 - 200), Probe 12 (Tag 201 - 219), Probe 13 (Tag 221 - 239), Probe 14 (Tag 240 - 260), Probe 15 (Tag 261 - 280), Probe 16 (Tag 281 - 300), Probe 17 (Tag 301 - 320) und schließlich Probe 18 (Tag 321 - 345). Während innerhalb der ersten 60 Tage in einem zeitlichen Abstand von ca. zwei Wochen Proben untersucht wurden, vergrößerten sich die Zeitfenster auf ca. drei Wochen bei den sich daran anschließenden Messungen.

## 2.3 Probenaufarbeitung und Amplifikation mittels PCR

Die Proben wurden randomisiert getestet und erst nach Vorliegen der Messergebnisse erfolgte die Zuordnung zu den einzelnen Patienten. Somit wurden in jedem Messdurchlauf Proben von unterschiedlichen Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten nach HSCT untersucht. Pro Lauf wurde aus 88 Patientenproben die TTV-Kopienzahl bestimmt. Hinzu kommen pro Lauf 2 · 3

Standards, bestehend aus 10000, 1000 und 100 Kopien TTV, sowie 2 Negativkontrollen aus aqua dest.

Die zu testenden Proben lagen als bei -20 Grad Celsius tiefgefrorene Eluate vor. Die TTV-DNA war zuvor mit Hilfe des EZ1 DNA Blood 200  $\mu$ l KIT der QIAGEN GmbH aus Hilden, Deutschland extrahiert worden. Das EZ1 DNA Blood 200  $\mu$ l KIT diente der Aufreinigung genomischer DNA aus Vollblutproben und Blutprodukten. Die Isolierung der DNA erfolgte durch Bindung an mit Kieselsäure beschichtete magnetische Partikel. Diese Prozesse erfolgten automatisiert durch den BioRobot EZ1 der QIAGEN GmbH aus Hilden, Deutschland.

Die Auswahl der Primer und der verwendeten Sonde erfolgte in Anlehnung an vorausgegangene Publikationen [44, 103, 104]. Dabei basierte das Testverfahren auf einem hoch konservierten Segment der viralen unübersetzten Region (UTR). Die Oligonukleotidsequenzen der eingesetzten Primer und der Sonde lauteten wie folgt: AMTS 18 Basenpaare *forward primer* 5' GTGCCGIAGGTGAGTTTA 3' Position 177-194 NT (Nukleotide); AMTAS 14 Basenpaare *reverse primer* 5' AGCCCGGCCAGTCC 3' Position 226-239 NT; AMTPTU 19 Basenpaare *TaqMan Sonde* 5' TCAAGGGGCAATTCGGGCT 3' Position 205-223 NT. Die Sonde war mit 6-Carboxyfluorescein und 6 Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin an ihren 5' und 3' Enden markiert.

Die Reaktionen erfolgten im 25  $\mu$ l Format. Dabei bestanden 20  $\mu$ l aus Universal PCR *Master Mix*, Primern, Sonde und Nuclease-freiem Wasser und 5  $\mu$ l aus Patientenprobe/5  $\mu$ l Standard/5  $\mu$ l Negativkontrolle. Der Standard wurde im Doppelansatz getestet. Nacheinander wurden 5  $\mu$ l von 10000, 1000 und 100 Kopien TTV zu den 20  $\mu$ l hinzugegeben. Der Universal PCR *Master Mix* bestand aus der AmpliTaq Gold<sup>TM</sup>DNA-Polymerase, der AmpErase<sup>TM</sup>Uracil N-Glycosylase, Desoxyribonukleosidtriphosphate mit Desoxyuridintriphosphaten und optimierten Pufferkomponenten. Die Konzentrationen der einzelnen Bestandteile im Einzelansatz stellten sich wie folgt dar: 12,5  $\mu$ l Universal *Master Mix*, jeweils 0,75  $\mu$ l *forward primer* und *reverse primer*, 0,25  $\mu$ l *TaqMan Sonde* und 5,75  $\mu$ l Nuclease-freies Wasser. Für die verwendete *MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate* des Herstellers applied biosystems wurde ein Multiplikator von 110 für die einzelnen Zusätze gewählt, um ausreichend Material zum Pipettieren von 96 *Cups* zu gewährleisten. Die Materialmengen für eine Platte betragen 1375  $\mu$ l Universal *Master Mix*, jeweils 82,5  $\mu$ l *forward primer* und *reverse primer*, 27,5  $\mu$ l *TaqMan Sonde* und 632,5  $\mu$ l Nuclease-freies Wasser.

Das Reaktionsgemisch wurde mit einem Volumen von 20  $\mu$ l in die einzelnen *Cups* der PCR Platte pipettiert. Die Herstellung und das sich daran anschließende Pipettieren des Reaktionsgemisches in die *MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate* erfolgte im Instituts-eigenen DNA-freien PCR-Master-Mix-Raum. Die dann folgende Hinzugabe von 5  $\mu$ l Patientenprobe wurde in einem anderen Raum unter laufender Werkbank durchgeführt. Die verwendeten Pipetten waren entweder

Einkanalpipetten (100 – 1000  $\mu\text{l}$ ; 20 – 200  $\mu\text{l}$ ; 10 – 100  $\mu\text{l}$ ; 0,5 – 10  $\mu\text{l}$ ) des Herstellers Eppendorf-Research, Hamburg, Deutschland, oder eine 8-Kanalpipette (30 – 300  $\mu\text{l}$ ) des gleichen Herstellers. Die *TipOne Filter Tip* Pipettenspitzen (0,1 – 10  $\mu\text{l}$ ; 1 – 20  $\mu\text{l}$ ; 1 – 200  $\mu\text{l}$ ; 101 – 1000  $\mu\text{l}$  Bevelled Filter Tips) waren Produkte der Starlab-GMBH, Ahrensburg, Deutschland. Im Anschluss an das Pipettieren wurde die *MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate* mit *Micro Amp Optical 8-Cap Strips* des Herstellers applied biosystems versehen und kurz anzentrifugiert, damit sich die Reaktionsinhalte absetzen und enthaltene Luftblasen beseitigt werden konnten.

## 2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die sich daran anschließende *Real Time*-PCR wurde mit dem ABI Prism 7500 Sequenz Detektionssystem durchgeführt und die Ergebnisse als  $\log_{10}$ -Kopien/ml aufgezeichnet. Die PCR Reaktion nutzte die 5' Nukleaseaktivität der AmpliTaq Gold<sub>TM</sub>DNA-Polymerase, um die *TaqMan* Sonde während des PCR Prozesses zu spalten. Grundlage dafür war die spezifische Bindung der *TaqMan* Sonde an eine komplementäre Sequenz des von *forward* und *reverse* Primer amplifizierten Bereiches. Die *TaqMan* Sonde enthielt einen Reporterfarbstoff am 5' Ende und einen Quencherfarbstoff am 3' Ende. Die 5' nach 3' nukleolytische Aktivität der DNA-Polymerase spaltete nur Sonden, die mit dem DNA-*Target* hybridisiert sind. Einmal gespalten, wurden Reporter- und Quencherfarbstoff voneinander getrennt, was zu einer erhöhten Fluoreszenz des Reporters führte. Die Akkumulation von PCR Produkten wurde direkt durch die Überwachung des Anstiegs der Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs nachgewiesen. Die TTV-DNA-Quantifizierung lag dabei im linearen Bereich von 2 bis 8  $\log_{10}$ -Kopien/mL.

Die Amplifikation und der Nachweis von PCR Produkten geschah durch:

1. Vorwärmen der Proben bei 50 Grad Celsius für 2 Minuten (diente der Beseitigung möglicher Verunreinigungen durch das im Mix vorhandene Enzym Amperase);
2. anschließendes Erhitzen auf 95 Grad Celsius für 10 Minuten (diente der Aktivierung der AmpliTaq Gold DNA-Polymerase);
3. gefolgt von 40 Denaturierungszyklen bei 95 Grad Celsius für 15 Sekunden;
4. letzter Schritt beinhaltete das Abkühlen auf 60 Grad Celsius für 1 Minute, bei der es zu einer spezifischen Bindung des Primers an sein einzelsträngiges DNA-*Template* kommt (*Annealing* + *Elongation*) (*Template* bezeichnet die Original DNA mit dem zu vervielfältigenden Abschnitt). Die Kopienzahlen wurden durch Interpolation der experimentell ermittelten Schwelle (*threshold*) bestimmt. Dabei wurde der *Threshold* aus den DNA-*Templates* der Standards generiert. Die Standards wiederum bestanden aus quantifizierter Plasmid-DNA, die kodierende Regionen des TTV enthielt.



Ein Patient galt als TTV-positiv, wenn am Tag  $\leq -15$  vor HSCT eine Kopienzahl von  $\geq 20$  Kopien/ml nachgewiesen wurde. Wenn in den verfügbaren Proben vor HSCT keine TTV-DNA ( $< 20$  Kopien/ml) nachweisbar war, wurde ein Patient als TTV-negativ betrachtet. Auf der Grundlage von Intra- und Inter-Assay-Variationsanalysen wurde für diesen internen PCR-Test der Schwellenwert von  $\geq 20$  Kopien/ml festgelegt. Ein Anstieg um  $0,5 \cdot \log$  wurde als signifikanter Anstieg angesehen.

## 2.5 Statistische Auswertung

Zu den verwendeten Statistikprogrammen zählen die GraphPad Prism Version 5.01, die R-Version 3.5.1, sowie die SPSS Version 25 (2017).

Zur Berechnung von statistisch signifikanten Unterschieden zwischen den Vergleichskollektiven wurde bei der Betrachtung von zwei Gruppen der T-Test und bei drei oder mehr Gruppen die *One-way-Anova* hinzugezogen. Dabei wurde überprüft, wie sich die Mittelwerte der untersuchten Populationen zueinander verhielten. Ein p-Wert von  $< 0.05$  wurde als signifikant betrachtet. Vorhandene Korrelationen wurden mit Hilfe des Spearmans Korrelationskoeffizienten berechnet, der als parameterfreies Maß den Zusammenhang zwischen zwei Variablen ausdrücken kann. Mit Hilfe des Statistikprogrammes Prism konnte für jeden Datensatz der einzelnen Gruppen der Median, das 25-%-Quartil, das 75-%-Quartil, Minimum und Maximum und der Mittelwert berechnet werden. Um einen möglichst genauen Eindruck von der Größenverteilung der Zahlenwerte zu gewährleisten, wurde in den folgenden Abbildungen der Median sowie das 25-%-Quartil und das 75-%-Quartil gekennzeichnet. Damit wird auf einen Blick ersichtlich, in welchem Bereich 50% der Daten angesiedelt sind.

Für den Vergleich der Torque-Teno-Viruslast zwischen ausgewählten Kollektiven wurde für jeden einzelnen Patienten die *Area under the curve* (AUC) der Tage 0 bis 50, 50-100 und 0-300 nach HSCT berechnet. Die „Fläche unter der Kurve“ entspricht dem mathematisch berechenbaren Integral und sollte die Gesamtviruslast innerhalb der festgesetzten Zeiträume ermitteln. Dazu wurde zunächst das Zeitfenster festgelegt, innerhalb dessen die bei jedem einzelnen Patienten erzielte Gesamt-TTV-DNA-Kopienzahl ausgerechnet werden sollte. Da wir davon ausgingen, dass innerhalb der ersten 100 Tage nach HSCT die gravierendsten Veränderungen der Plasma-TTV-DNA-Kopienzahl stattfinden und die ersten Wochen und Monate nach HSCT auch klinisch von außerordentlicher Relevanz sind, entschieden wir uns, zwei Zeitintervalle innerhalb der ersten 100 Tage zu bilden, um die individuelle Viruslast möglichst genau erfassen zu können. Wir hofften uns davon auch, ausgehend von dem Ausmaß der Virusbelastung des einzelnen Patienten innerhalb der ersten 50 bzw. 100 Tage nach HSCT, Aussagen hinsichtlich des Langzeitverlaufes tätigen zu können. Um einen Überblick hinsichtlich der Torque-Teno-Viruslast im gesamten

Beobachtungszeitraum zu gewährleisten und potentiell auftretende höhergradige Veränderungen über den 100. Tag nach HSCT hinaus zu erfassen, wurde auch die AUC 0-300 für alle 123 Patienten ermittelt. Alle in dem Zeitfenster verfügbaren Messwerte wurden daher zu einer „TTV-Kopienzahl – Zeit – Kurve“ zusammengefasst. Der Bereich, der durch die Kurve eingeschlossen wird, entspricht dann der Gesamtviruslast, die innerhalb dieses Zeitraums erreicht wurde. Dabei konnte es vorkommen, dass die Blutabnahmen der einzelnen Patienten nicht an übereinstimmenden Tagen nach HSCT durchgeführt wurden. Das erklärt auch, warum die Messpunkte, die die „TTV-Kopienzahl – Zeit – Kurve“ bilden, unter den Patienten variieren. Daher kann nicht vermieden werden, dass auch der erste und letzte verfügbare Messwert eines einzelnen Patienten gegebenenfalls von den festgesetzten Start- und Endpunkten der vorgegebenen Zeitintervalle abweichen.

Beginnend mit dem Tag der HSCT (Tag 0) für Zeiträume von jeweils 30 Tagen (Tage 0-30, 30-60, 60-90, etc.) wurden überdies die tatsächlichen Einzelviruslasten (PCR-TT-Viruslast-Ergebnisse) definierter Gruppen mit einem t-Test auf Signifikanz überprüft. Wie oben bereits angemerkt, wurde den ersten 100 Tagen von unserer Seite aus das größte TT-Viruslast Veränderungspotential zugeschrieben. Um zusätzliche Aussagen hinsichtlich der Entwicklung, das heißt zu Steilheit bzw. Geschwindigkeit des Anstieges der Viruslast treffen zu können, wurde neben der Erstellung der AUCs und dem Vergleich der tatsächlich ermittelten Roh-Viruslasten bei einzelnen Gruppen die Steigung zwischen Tag 0 und 110 nach HSCT ermittelt. Start- und Endpunkt wurden dabei linear interpoliert. Um auch den 100. Tag in die Berechnung der Steigung miteinfließen zu lassen, wurden die verfügbaren Viruslasten der ersten sieben beschriebenen Zeitintervalle ausgewählt. Das siebte Intervall umfasste die Tage 100 bis 119, aber nur in den seltensten Fällen wurden Proben genau an Tag 100 nach HSCT entnommen. Daher wurde als obere Grenze, innerhalb dessen die Steigung der Viruslast bestimmt werden sollte, der erste Tag festgesetzt, der den 100. Tag überschreitet. Das Zeitfenster von Tag 0 und 110 gewährleistete damit bei allen Patienten eine Miteinbeziehung des 100. Tages.

Ziel sollte es ebenfalls sein, eine bessere Übersicht der Entwicklung der TT-Viruslast aller Patienten über die Zeit nach HSCT zu ermöglichen. Mit einem zeitlichen Umfang von 15 Tagen wurden Zeitfenster zwischen dem Tag 75 vor HSCT bis zu dem Tag 345 nach HSCT festgesetzt. Die in den beschriebenen Zeiträumen erhobenen Viruslasten aller Patienten wurden als Grundlage für die Berechnung einer Median-TT-Viruslast herangezogen. Damit wird auf einen Blick ersichtlich, wo 50 Prozent der Viruslasten aller Patienten in den 13 betrachteten Zeiträumen liegen. Damit kommt neben der Gegenüberstellung der AUCs, dem Vergleich der jeweiligen TT-Einzelviruslasten und der Beurteilung der Steigung eine weitere graphische Darstellung zum Einsatz, die letzten Endes eine Kombination der zuvor beschriebenen Vorgehensweisen darstellt. Auf der einen Seite ist es möglich, über den Abstand der Kurve zur X-Achse eine Abschätzung der Gesamtviruslast vorzunehmen, auf der anderen Seite können über den Verlauf der Kurve



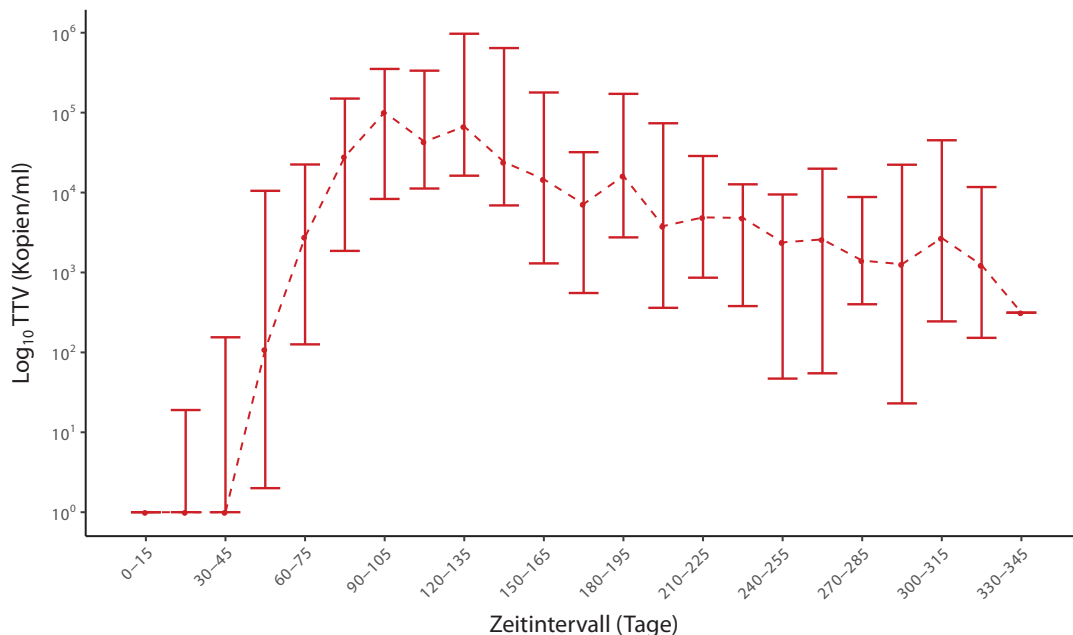
Aussagen hinsichtlich der Veränderung der TT-Viruslast über die Zeit und somit auch über die Steilheit des Anstieges getroffen werden.

Die klinisch notwendigen Informationen wurden den Arztbriefen der einzelnen Patienten aus dem Krankenhaus Informationssystem Medico entnommen und in einem zweiten Schritt von Ärzten der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf auf ihre Vollständigkeit überprüft.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 TT-Viruslast Gesamtkollektiv

Der Darstellung über die Entwicklung der TT-Viruslast des Gesamtkollektives über die Zeit (Abb. 1) ist zu entnehmen, dass sich etwa bis Tag 100 ein deutlicher Anstieg von knapp 0 TTV Kopien/ml auf etwa  $10^5$  TTV Kopien/ml zeigte. Zu Beginn und zum Ende des Beobachtungszeitraumes ergaben sich die größten Schwankungen und Abweichungen von den ermittelten Medianen. Im Zeitraum von Tag 100 bis 140 nach HSCT stellte sich eine vorübergehende Phase des Gleichgewichtes ein. Darauf folgte eine recht gleichförmige Abwärtsbewegung um zwei Zehnerpotenzen, die ihren Tiefpunkt zwischen  $10^2$  und  $10^3$  TTV Kopien/ml erreichte.



**Abb. 1: Übersichtsgraph der Entwicklung der Torque-Teno-Virus (TTV)-Last der 123 Patienten im Zeitraum von Tag 0 bis 345 nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT).** Die Punkte repräsentieren die Mediane, die aus den vorhandenen Viruslasten aller Patienten in den jeweils betrachteten Zeiträumen von 15 Tagen gebildet wurden. Eingezeichnet sind überdies der 25. Interquartilsabstand (unterer Balken) und der 75. Interquartilsabstand (oberer Balken).

In einem nächsten Schritt wurden nun die Log<sub>10</sub> TTV-DNA-Gesamtviruslasten der Patienten – ausgedrückt in der Area under curve – betrachtet, die zwischen den Tagen 0 bis 50, 50 bis 100 und 0 bis 300 nach HSCT erzielt werden konnten. Für das Gesamtkollektiv der 123 untersuchten Patienten lag der Median der AUC 0-50 bei  $2,60e4 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ , der AUC 50-100 bei  $4,67e6 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$  und der AUC 0-300 bei  $1,09e7 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

### 3.2 TT-Viruslast in Abhängigkeit von dem Geschlecht

Verglichen wurde die Torque-Teno-Viruslast von 74 Männern und 49 Frauen. Es zeigte sich bei dem Vergleich der AUC 0-50 Werte zwischen den Gruppen Männer vs Frauen mit einem P-Wert von 0,6 kein signifikanter Unterschied, wenngleich sich bei der Betrachtung der Mittelwerte ein Trend hin zu höheren Viruslasten bei Männern abzeichnete ( $3,33e6 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup> vs  $2,41e6 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup>). Wurden die TTV-DNA-Kopienzahlen der Männer und Frauen im Zeitraum von Tag 50 bis 100 nach HSCT miteinander verglichen, zeigte sich ein nahezu doppelt so großer Mittelwert für die TTV-DNA-Kopienzahl der Männer verglichen mit dem der Frauen ( $2,59e7 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup> vs  $1,38e7 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup>). Mit einem P-Wert von 0,1 war diese Differenz allerdings nicht als signifikant einzustufen. Die Gesamtviruslasten der AUC 0-300 der Männer lagen mit einem p-Wert von 0,02 signifikant über den Viruslasten der AUC 0-300 der Frauen und wiesen einen mehr als doppelt so großen Mittelwert von  $9,81e7 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup> für die Gruppe der Männer verglichen mit dem Mittelwert von  $3,98e7 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup> für die Gruppe der Frauen auf. Mit einem P-Wert von 0,08 war zwar kein signifikanter Unterschied der Peakwerte zwischen Männern und Frauen zu erkennen, doch auch hier waren die höheren Mittelwerte den Männern zuzuordnen.

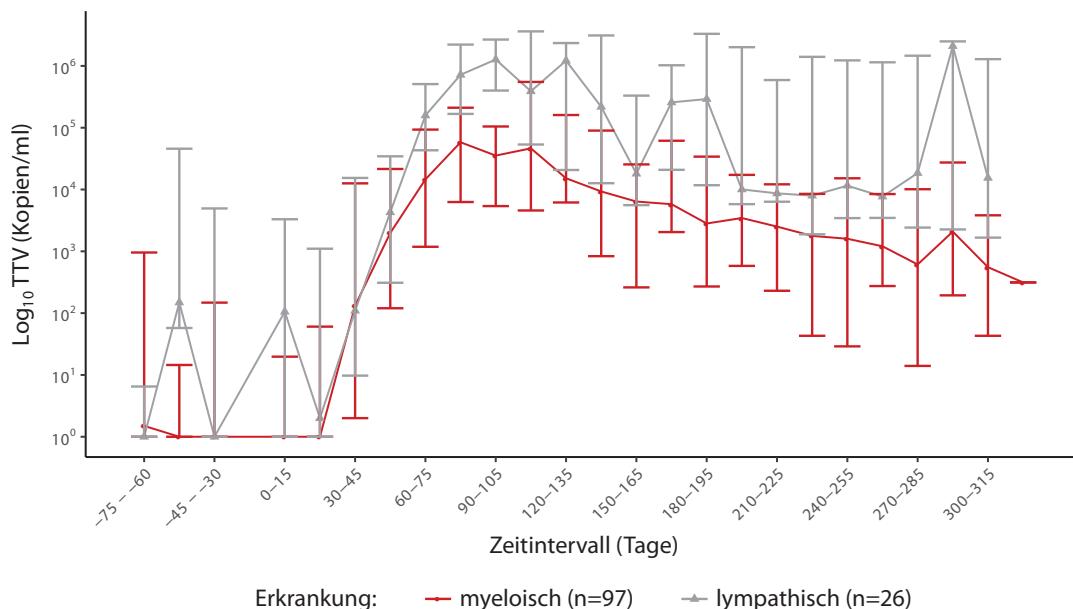
### 3.3 TT-Viruslast in Abhängigkeit von der Grunderkrankung

Verglichen wurde die Torque-Teno-Viruslast von 97 myeloisch und 26 lymphatisch erkrankten Patienten. Dabei wurden die Patienten mit einer AML (n= 59), mit einem MDS (n= 33) und mit einer primären und sekundären Osteomyelofibrose (n= 5) zu der Gruppe der myeloisch erkrankten Patienten zusammengefasst. Die Gruppe der lymphatisch erkrankten Patienten setzte sich zusammen aus Patienten mit einem NHL (n= 11), einem multiplen Myelom (n= 3), einer ALL (n= 9), einer CLL (n= 1), einer T-PLL und einer diffusen systemischen Sklerodermie (n= 1).

Beginnend bei der AUC 0-50 ergaben sich sowohl bei der AUC 50-100 als auch bei der AUC 0-300 sowie bei den Peakwerten im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nach HSCT eindeutig höhere TT-Viruslasten für die lymphatisch erkrankten Patienten. Anfänglich zeigten sich bei der Betrachtung der AUC 0-50 Werte der Gruppen myeloisch vs lymphatisch Erkrankte mit einem P-Wert von 0,2 keine signifikanten Unterschiede. Dennoch war bereits hier ein klarer Trend hin zu einer mehr als doppelt so großen mittleren TTV-DNA-Kopienzahl bei lymphatisch erkrankten Patienten festzustellen ( $5,16e6 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup> vs  $2,41e6 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup>). Die Unterschiede wurden im weiteren Beobachtungszeitraum noch deutlicher: Während die Mediane der AUC 50-100 beider Gruppen in etwa das Zehnfache ( $3,05e7 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup> vs  $3,07e6 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup>) trennte, zeigt sich für die Mediane

der AUC 0-300 eine Größendifferenz von zwei Zehnerpotenzen ( $1,61e8 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$  vs  $7,30e6 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Bezogen auf den Mittelwert der AUC 0-300 wiesen Patienten mit einer lymphatischen Erkrankung nahezu das Zehnfache der Gesamtviruskonzentration auf ( $2,26e8 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$  vs  $3,54e7 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Dies spiegelte sich in dem hoch signifikanten P-Wert von  $< 0,0001$  wider. Einen ebenfalls hoch signifikanten Unterschied ( $p < 0,0001$ ) zeigte der Vergleich der Peakwerte – mit einem vierfach höheren mittleren Peakwert für die Gruppe der lymphatisch erkrankten Patienten ( $2,75e6 \text{ Kopien/ml}$  vs  $6,74e5 \text{ Kopien/ml}$ ).

In einem weiteren Schritt wurde die Steigung für jeden einzelnen Patienten zwischen Tag 0 und Tag 110 berechnet und die Patienten anschließend ihrer Gruppenzugehörigkeit entsprechend sortiert. Patienten mit einer lymphatischen Grunderkrankung wiesen dabei ein signifikant größeres ( $p < 0,05$ ) mittleres Steigungspotential auf ( $2,05e4 \text{ (TTV DNA Kopien/ml)/Tag}$ ) vs  $2,60e3 \text{ (TTV DNA Kopien/ml)/Tag}$ ).



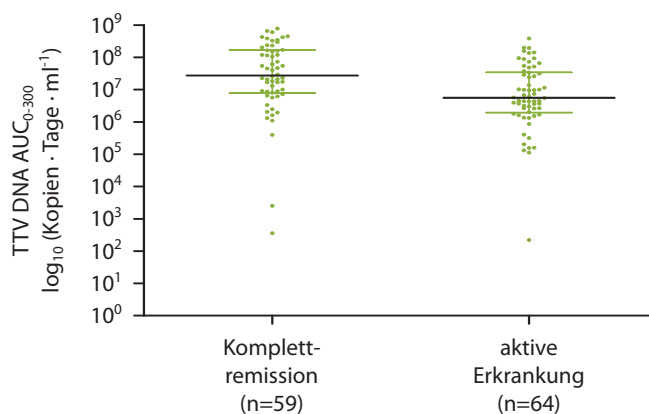
**Abb. 2: Übersichtsgraph der Entwicklung der Torque-Teno-Virus (TTV)-Last zwischen Tag 75 vor bis Tag 315 nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) im Hinblick auf die vorliegende Grunderkrankung.** Unterschieden wurden die Gruppen mit einer myeloischen (rot dargestellt) und einer lymphatischen (grau dargestellt) Erkrankung. Die Punkte repräsentieren die Mediane, die aus den vorhandenen Viruslasten aller Patienten einer Gruppe in den jeweils betrachteten Zeiträumen von 15 Tagen gebildet wurden. Eingezeichnet sind überdies der 25. Interquartilsabstand (unterer Balken) und der 75. Interquartilsabstand (oberer Balken).

Wurden nun aus den regelmäßig erhobenen reinen Viruslasten der Patienten beider Gruppen die Mediane in aufeinander folgenden Zeitfenstern von 15 Tagen gebildet, konnte die Entwicklung der TT-Viruslast zwischen Tag 75 vor HSCT bis Tag 315 nach HSCT für die myeloisch und lymphatisch erkrankten Patienten nachvollzogen werden (Abb. 2). Dabei zeigte sich, dass

bereits vor HSCT und somit vor Tag 0 Patienten mit einer lymphatischen Erkrankung um zwei Zehnerpotenzen höhere Viruslasten aufwiesen. Während innerhalb der ersten Tage nach HSCT kein Unterschied zwischen den Viruslasten beider Gruppen zu verzeichnen war, lag beginnend etwa ab Tag 50 nach HSCT die Kurve der lymphatisch Erkrankten konsequent oberhalb der Gruppe der myeloisch Erkrankten. Die größeren Schwankungen in der Kurve der lymphatisch Erkrankten waren vermutlich auf die geringere Anzahl an Patienten zurückzuführen.

### 3.4 TT-Viruslast in Abhängigkeit von dem Remissionsstatus vor HSCT

Verglichen wurde die Torque-Teno-Viruslast von 59 Patienten, unabhängig von der Erkrankung, mit Komplettremission (KR) sowie von 64 Patienten mit aktiver Erkrankung (AE) zum Zeitpunkt der HSCT. In die Gruppe der Patienten mit Komplettremission waren auch Patienten mit partieller Remission mit eingeflossen. Es sollte zwischen Patienten mit und ohne Therapieansprechen im Vorfeld der HSCT differenziert werden.

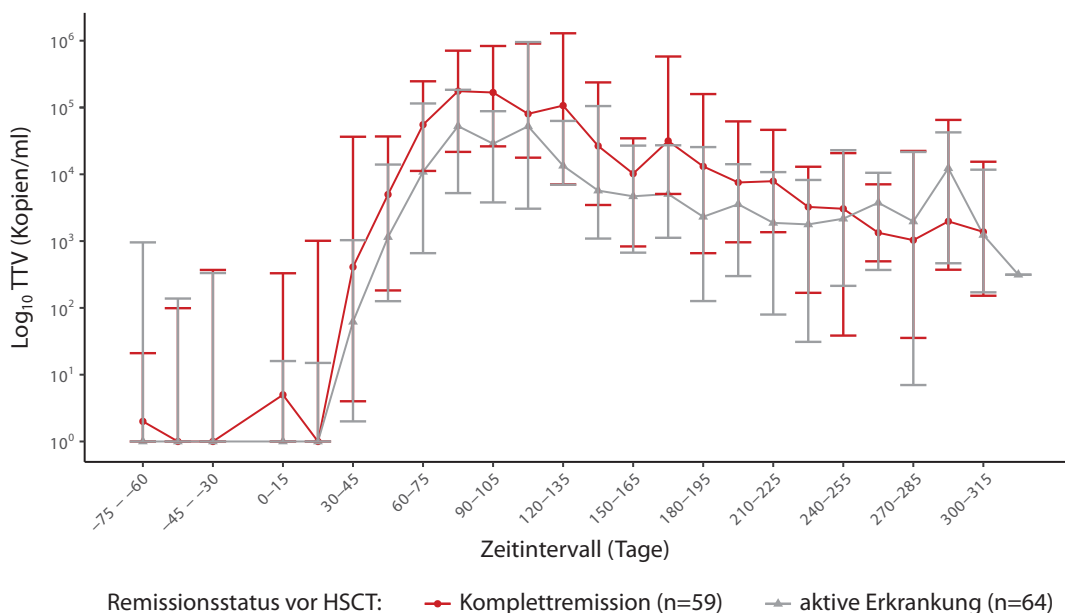


**Abb. 3: Vergleich der Plasma Torque-Teno-Virus (TTV) DNA Area under curve (AUC) für die Tage 0 bis 300 nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) im Hinblick auf den vorliegenden Remissionsstatus vor HSCT.** Unterschieden wurden die Gruppen mit einer Komplettremission und einer aktiven Erkrankung vor HSCT. Jeder Punkt repräsentiert die AUC 0-300 eines einzelnen Patienten. „n“ entspricht der Anzahl der Patienten. „p“ gibt den Signifikanzwert an. Mit einem p-Wert von 0.0004 zeigt sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit höheren Viruslasten für die Gruppe „Komplettremission“. Eingezeichnet sind der Median (schwarzer mittlerer Balken) und der Interquartilsabstand (unterer farbiger Balken 25. Interquartilsabstand, oberer farbiger Balken 75. Interquartilsabstand).

Mit einem mehr als dreifach höheren Median der Gruppe KR ( $5,43e4 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$  vs  $1,66e4 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) zeichneten sich bereits bei der AUC 0-50 größere Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen ab – mit 0,08 war der P-Wert aber noch nicht im signifikanten Bereich. Hoch signifikante Unterschiede ( $p=0,01$ ) zeigte der Vergleich der AUC 50-100 Werte beider Gruppen mit einer zweieinhalbfach höheren mittleren TT-Viruslast für die Gruppe KR ( $3,18e7 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$  vs  $1,23e7 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Der P-Wert von 0,0004

verdeutlichte die hoch signifikanten Unterschiede, die im Vergleich der Gesamt-TT-Viruslasten für den Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nach HSCT gefunden werden konnten (Abb. 3). Der Median der AUC 0-300 der Patienten mit KR betrug  $2,74e7 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$  und lag damit fünffach über dem Median der AUC 0-300 der Patienten mit AE ( $5,58e6 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Eine Differenz von etwa dem Doppelten trennte die mittleren Peakwerte beider Gruppen.

Abbildung 4 zeigt den Vergleich der aus den reinen Viruslasten der Patienten beider Gruppen ermittelten Mediane in aufeinander folgenden Zeitfenstern von 15 Tagen zwischen Tag 75 vor HSCT bis Tag 315 nach HSCT. Festzuhalten war dabei, dass die TT-Viruslast der Patienten mit einer Komplettremission vor HSCT nach HSCT nahezu konsequent oberhalb der TT-Viruslast der Patienten mit aktiver Erkrankung vor HSCT verläuft.



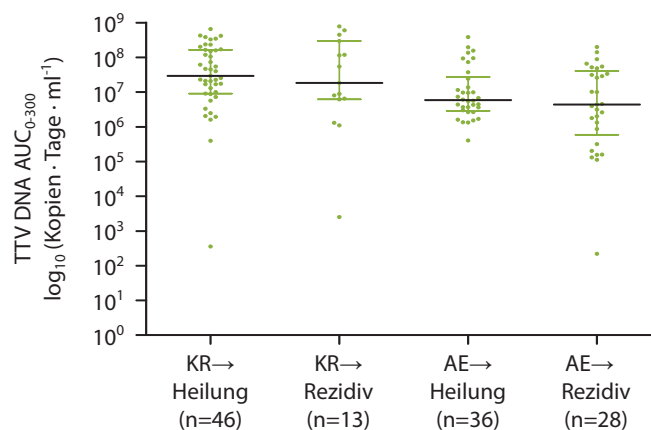
**Abb. 4: Übersichtgraph der Entwicklung der Torque-Teno-Virus (TTV)-Last zwischen Tag 75 vor bis Tag 315 nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) im Hinblick auf den vorliegenden Remissionsstatus vor HSCT.** Unterschieden wurden die Gruppen mit einer Komplettremission (rot dargestellt) und einer aktiven Erkrankung (grau dargestellt) vor HSCT. Die Punkte repräsentieren die Mediane, die aus den vorhandenen Viruslasten aller Patienten einer Gruppe in den jeweils betrachteten Zeiträumen von 15 Tagen gebildet wurden. Eingezeichnet sind überdies der 25. Interquartilsabstand (unterer Balken) und der 75. Interquartilsabstand (oberer Balken).

In einem zweiten Schritt sollte überprüft werden, wie sich die Viruslast in Abhängigkeit von der Entwicklung des Remissionsstatus verhält. Dazu wurden vier Kollektive gebildet:

1. Patienten, die aus der KR vor HSCT im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nach HSCT geheilt blieben (n= 46) (KR → Heilung);

2. Patienten, die aus der KR vor HSCT im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nach HSCT ein Rezidiv erlitten (n=13) (KR → Rezidiv);
3. Patienten, bei denen trotz AE vor HSCT im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nach HSCT eine Heilung der Erkrankung auftrat (n=36) (AE → Heilung)
4. Patienten, die mit einer AE vor HSCT im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nach HSCT ein Rezidiv erlitten (n=28) (AE → Rezidiv).

Mit einem P-Wert von 0,4 zeichnete sich auf den ersten Blick kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der AUC 0-50 der vier Gruppen ab. Wurden nun die AUC 50-100 Werte der vier Kollektive miteinander verglichen, ließ sich erkennen, dass die Gruppe AE → Rezidiv mit ihrer TTV-Kopienzahl im Median und im Mittel unterhalb der Viruslasten der Vergleichsgruppen lag. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen AE → Rezidiv und KR → Rezidiv ( $p=0,02$ ) und den Gruppen AE → Rezidiv und KR → Heilung ( $p=0,04$ ). Für die AUC 0-300 zeigte sich ein hoch signifikanter P-Wert von 0,002 zwischen den vier untersuchten Gruppen (Abb. 5). Wurden nun die P-Werte zwischen den einzelnen Gruppen noch einmal näher betrachtet, zeigten sich hoch signifikante Unterschiede für die Gruppen (nach absteigender Signifikanz): AE → Rezidiv vs KR → Rezidiv, AE → Rezidiv vs KR → Heilung, KR → Rezidiv vs AE → Heilung, und KR → Heilung vs AE → Heilung. Die größte Differenz der Mittelwerte bestand zwischen den Gruppen AE → Rezidiv und KR → Rezidiv – mit einer sechsfach höheren TT-Viruslast für die Gruppe KR → Rezidiv ( $1,64e8 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$  vs  $2,80e7 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Der Vergleich der Peakwerte der einzelnen Gruppen zeigte einen signifikanten P-Wert von 0,02.



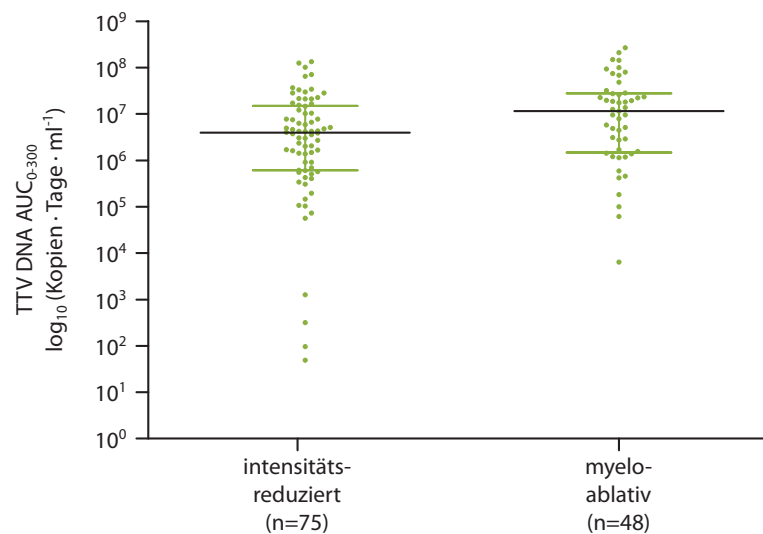
**Abb. 5: Vergleich der Plasma Torque-Teno-Virus (TTV) DNA Area under curve (AUC) für die Tage 0 bis 300 nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) im Hinblick auf die klinische Entwicklung nach HSCT abhängig von dem Remissionsstatus vor HSCT.** Unterschieden wurden dabei vier Gruppen: die Gruppe Patienten, die aus einer Komplettremission (KR) vor HSCT auch nach HSCT geheilt blieben (KR → Heilung), die Gruppe Patienten, die aus einer KR vor HSCT nach HSCT ein Rezidiv entwickelten (KR → Rezidiv), die Gruppe Patienten, die aus einer aktiven Erkrankung (AE) vor HSCT nach HSCT geheilt wurden (AE → Heilung) und die Gruppe Patienten, die aus einer AE vor HSCT nach HSCT ein Rezidiv entwickelten (AE → Rezidiv). Jeder Punkt repräsentiert die AUC 0-300 eines einzelnen Patienten. „n“ entspricht der Anzahl der Patienten. Der Pfeil → steht für „wird zu“. „p“ gibt den Signifikanzwert an. Mit einem p-Wert von 0.001 zeigt sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den vier Gruppen. Eingezeichnet sind der Median (schwarzer mittlerer Balken) und der Interquartilsabstand (unterer farbiger Balken 25. Interquartilsabstand, oberer farbiger Balken 75. Interquartilsabstand).

### 3.5 TT-Viruslast in Abhängigkeit von der Konditionierungstherapie

Verglichen wurde die Torque-Teno-Viruslast von 48 Patienten mit myeloablativem und 75 Patienten mit intensitätsreduziertem Konditionierungsregime. Der Vergleich der Mittelwerte für die AUC 0-50 zeigte keine signifikante Größendifferenz, wengleich der Mittelwert und Median der Gruppe der vor HSCT myeloablativ behandelten Patienten zweimal höher lag als die ermittelten TT-Viruslasten der intensitätsreduziert behandelten Patienten. Der P-Wert von 0,01 spiegelte die hoch signifikante Differenz der Mittelwerte für die AUC 50-100 der untersuchten Gruppen wider – mit einem mehr als zweifach höheren Mittelwert für die Gruppe der myeloablativ behandelten Patienten ( $3,29e7 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$  vs  $1,35e7 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Der Vergleich der AUC 0-300 Zahlenwerte zeigte (Abb. 6), dass hier die mittlere Viruslast der Gruppe mit myeloablativem Konditionierungsregime zweifach und damit signifikant über der mittleren TT-Viruslast der Gruppe mit intensitätsreduziertem Konditionierungsregime lag. Diese Signifikanz drückte sich in einem P-Wert von 0,01 aus. Damit zogt sich der anfangs beobachtete Trend hin zu höheren Viruslasten bei myeloablativ behandelten Patienten durch den gesamten Beobachtungszeitraum und erreichte sowohl bei der AUC 50-100 als auch bei der AUC 0-300 ein signifikantes Niveau. Auch der Vergleich der Peakwerte zeigte eine statistisch signifikante Differenz ( $p=0,02$ ). Damit wiesen Patienten mit einer myeloablativen Konditionierungstherapie



vor HSCT im Zeitraum von 300 Tagen nach HSCT durchgängig höhere Gesamt-TT-Viruslasten und höhere Spitzenwerte auf.

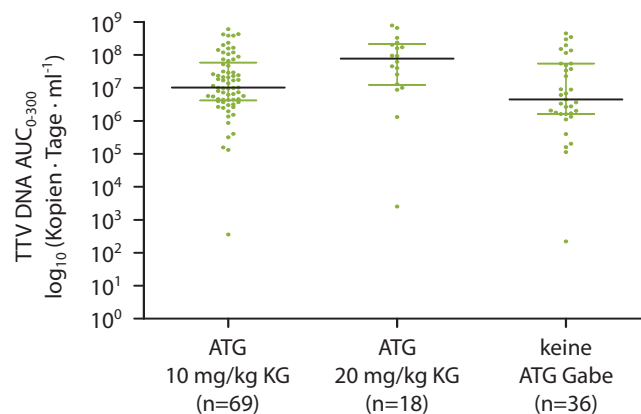


**Abb. 6: Vergleich der Plasma Torque-Teno-Virus (TTV) DNA Area under curve (AUC) für die Tage 0 bis 300 nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) im Hinblick auf das verwendete Konditionierungsregime.** Unterschieden wurden die Gruppen mit einem intensitätsreduzierten und einem myeloablativem Konditionierungsregime. Jeder Punkt repräsentiert die AUC 0-300 eines einzelnen Patienten. „n“ entspricht der Anzahl der Patienten. „p“ gibt den Signifikanzwert an. Mit einem p-Wert von 0.01 zeigt sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit höheren Viruslasten in der Gruppe „myeloablativ“. Eingezeichnet sind der Median (schwarzer mittlerer Balken) und der Interquartilsabstand (unterer farbiger Balken 25. Interquartilsabstand, oberer farbiger Balken 75. Interquartilsabstand).

### 3.6 TT-Viruslast in Abhängigkeit von der ATG Dosierung

Verglichen wurde die Torque-Teno-Viruslast von 69 Patienten mit einer Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht (KG), sowie von 18 Patienten mit einer ATG-Dosierung von 20mg/kg KG und von 36 Patienten, denen kein ATG verabreicht wurde. Der Vergleich der Zahlenwerte der drei untersuchten Gruppen für die AUC der ersten 50 Tage zeigte bezogen auf die Mittelwerte keinen signifikanten Unterschied. Bei Betrachtung der Mediane der AUC 0-50 für die drei Gruppen war zu erkennen, dass die größte Differenz zwischen der Gruppe ATG 20 mg/kg KG und der Gruppe ohne ATG Gabe bestand ( $6,07e4 \log_{10} \text{Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$  vs  $5,23e3 \log_{10} \text{Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Mit einem P-Wert von 0,1, der sich aus dem Gesamtgruppenvergleich der Mittelwerte der AUC 50-100 ergab, zeigte sich zunächst kein signifikanter Unterschied. Wurden nun aber in einem zweiten Schritt die P-Werte analysiert, die sich im Vergleich der Mittelwerte von jeweils zwei Gruppen ergaben, sah man einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ATG 10 mg/kg KG ( $1,75e7 \log_{10} \text{Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) und ATG 20 mg/kg KG ( $3,90e7 \log_{10} \text{Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) ( $p=0,03$ ). Knapp das Neunfache trennten die

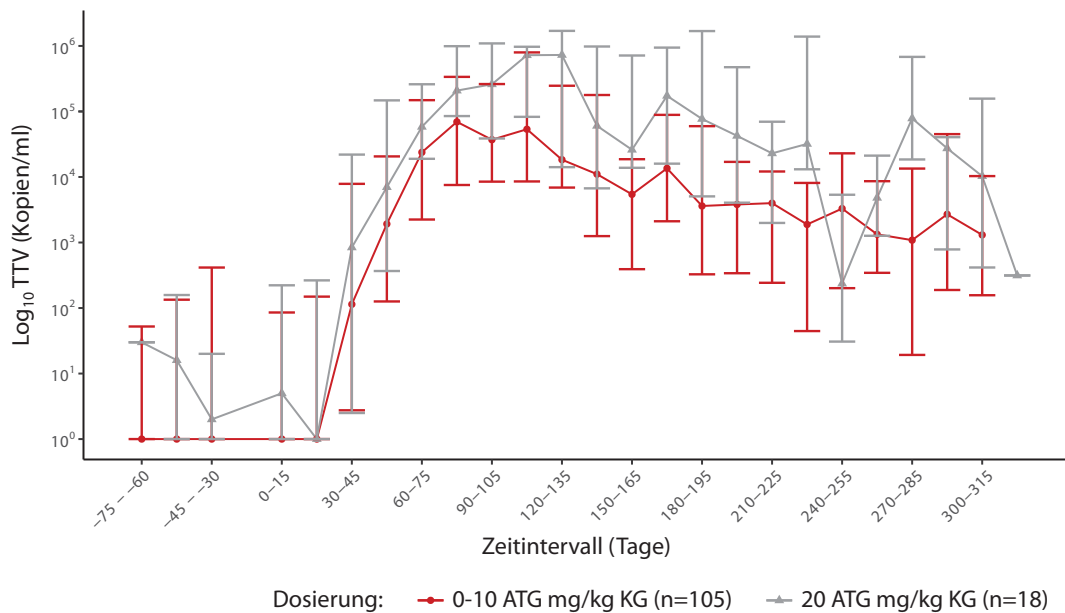
Mediane der Gruppen mit einer ATG Gabe von 20 mg/kg KG ( $1,83e7 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$ ) und ohne eine ATG Gabe ( $2,05e6 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$ ). In Analogie zum Vergleich der Mediane der AUC 0-50 lagen auch bei der AUC 50-100 die Mediane der Gruppen mit einer ATG Gabe von 10 mg/kg KG und ohne eine ATG Gabe am dichtesten beieinander. Wurden die über die ersten 300 Tage nach HSCT berechneten AUC Werte miteinander verglichen (Abb. 7), ergaben sich eindeutig signifikante Unterschiede im Gesamtgruppenvergleich ( $p= 0.02$ ). Bei näherer Betrachtung zeigten sich auch zwischen den Gruppen signifikante Differenzen der Zahlenwerte, die sich in einem P-Wert von etwa 0,01 für die Gruppen ATG 20 mg/kg KG vs 10 mg/kg Kg und in einem P-Wert von etwa 0,02 für die Gruppen ATG 20 mg/kg KG vs keine ATG Gabe widerspiegelten. Der Median der Gruppe mit einer ATG Dosierung von 20 mg/kg KG ( $7,71e7 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$ ) lag siebenmal oberhalb des Medians der Gruppe mit einer ATG Dosierung von 10 mg/kg KG ( $1,03e7 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$ ) und 17fach über dem Median der Gruppe ohne ATG Gabe ( $4,49e6 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$ ). Wurden die Peakwerte der einzelnen Gruppen miteinander verglichen, zeigte sich, dass die Gruppe ATG 20 mg/kg KG mit ihrem Median eine Zehnerpotenz über den Medianen der Vergleichsgruppen lag.



**Abb. 7: Vergleich der Plasma Torque-Teno-Virus (TTV) DNA Area under curve (AUC) für die Tage 0 bis 300 nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) im Hinblick auf die verwendete Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) Dosierung.** Unterschieden wurden die Gruppen mit einer ATG Dosierung von 10 mg/kg KG, einer ATG Dosierung von 20 mg/kg KG und die Gruppe, die kein ATG erhielt. Jeder Punkt repräsentiert die AUC 0-300 eines einzelnen Patienten. „n“ entspricht der Anzahl der Patienten. „p“ gibt den Signifikanzwert an. Mit einem p-Wert von 0.02 zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen. Die Einheit, in der ATG verabreicht wurde, ist Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht, abgekürzt durch mg/kg KG. Eingezeichnet sind der Median (schwarzer mittlerer Balken) und der Interquartilsabstand (unterer farbiger Balken 25. Interquartilsabstand, oberer farbiger Balken 75. Interquartilsabstand).

Für den gesamten Beobachtungszeitraum von 300 Tagen (einschließlich der Peakwerte) ließ sich damit beobachten, dass die Gruppe der Patienten, denen ATG in einer Dosierung von 20 mg/kg KG und damit in höchster Dosierung verabreicht wurde, von Beginn an mit ihren Medianen und Mittelwerten der TT-Viruslast über denen der Vergleichsgruppen lag. Prägte sich dieses Phänomen anfangs erst noch als zu beobachtender Trend aus, entwickelten sich im Verlauf hoch signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe ATG Dosierung von 20 mg/kg KG mit der

Gruppen ATG Dosierung von 10 mg/kg KG und der Gruppe ohne ATG Gabe. Weiterhin war zu beobachten, dass die Gruppe der Patienten, die kein ATG erhielten, durchweg niedrigere Viruslasten aufwiesen als die Patienten, denen ATG in unterschiedlicher Dosierung verabreicht wurde. Die bezogen auf die Zahlenwerte größten Unterschiede zeigten sich allerdings zu der Gruppe der Patienten mit der ATG Dosierung von 20 mg/kg KG, wohingegen die Gruppen ATG Gabe von 10 mg/kg KG und ohne ATG Gabe verhältnismäßig nahe beieinander lagen.



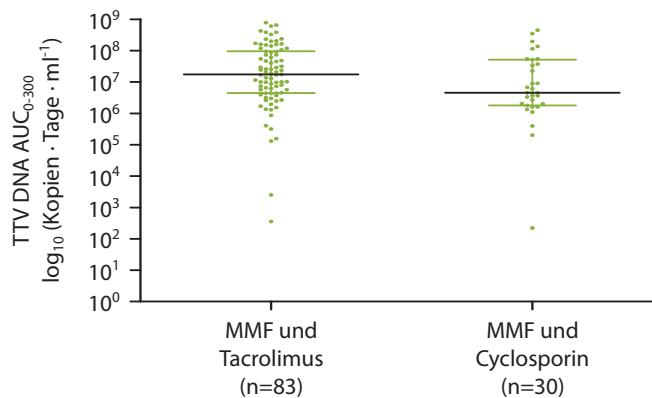
**Abb. 8: Übersichtsgraph der Entwicklung der Torque-Teno-Virus (TTV)-Last zwischen Tag 75 vor HSCT bis Tag 315 nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) im Hinblick auf die verwendete Anti-Thymozyten-Globulin (ATG)-Dosierung.** Unterschieden wurden die Gruppen, die kein ATG oder ATG in einer Dosierung von 10 mg/kg KG erhielten (rot dargestellt) und die Gruppe mit einer ATG Dosierung von 20 mg/kg KG (grau dargestellt). Die Einheit, in der ATG verabreicht wurde, lautet Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht, abgekürzt durch mg/kg KG. Die Punkte repräsentieren die Mediane, die aus den vorhandenen Viruslasten aller Patienten in den jeweils betrachteten Zeiträumen von 15 Tagen gebildet wurden. Eingezeichnet sind überdies der 25. Interquartilsabstand (unterer Balken) und der 75. Interquartilsabstand (oberer Balken).

Wurde die reine Viruslast beider Gruppe über die Zeit aufgetragen (Abb. 8), bestätigte sich die Beobachtung erhöhter Viruslasten bei Patienten mit einer ATG-Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht verglichen mit den Viruslasten der Patienten mit einer ATG-Dosierung von 10 mg/kg KG oder denen ohne ATG Gabe. Dies zeichnete sich bereits in den Tagen vor HSCT ab. Von Tag 30 nach HSCT an grenzte sich die Kurve der TT-Viruslast der Patienten mit einer ATG-Dosierung von 20 mg/kg KG sichtbar von der Kurve der Patienten mit einer ATG-Dosierung von 0 bis 10 mg/kg KG ab. Zwischen den Tagen 100 und 220 nach HSCT war die Differenz beider Kurven am größten. Ab Tag 240 nach HSCT kam es zu einem vorübergehenden Abfall der Viruslast bei den Patienten mit einer ATG-Gabe von 20 mg/kg KG, wofür ein Grund in der niedrigeren Patientenanzahl gesehen werden kann, die sich anfälliger für ausgeprägte Schwankungen darstellt. Bereits ab Tag 260 überstieg die TT-Viruslast der Patienten mit einer

ATG-Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht die der Patienten mit keiner oder einer nur halb so groß ausgeprägten ATG-Gabe.

### 3.7 TT-Viruslast in Abhängigkeit von der GvHD-Prophylaxe

Verglichen wurde die Torque-Teno-Viruslast von 83 Patienten mit einer GvHD-Prophylaxe bestehend aus Mycophenolatmofetil (MMF) und Tacrolimus und 30 Patienten mit einer GvHD-Prophylaxe bestehend aus MMF und Cyclosporin A. Mit einem P-Wert von 0,3 zeigte sich keine signifikante Größendifferenz zwischen den Mittelwerten der AUC 0-50 beider Gruppen, dennoch ließ sich zumindest ein Trend hin zu einer doppelt so großen Viruslast bei Patienten mit Tacrolimus erkennen. Der Median der AUC 50-100 der Gruppe mit Tacrolimus lag annähernd zweieinhalbmal über dem Median der AUC 50-100 der Gruppe mit Cyclosporin A – dennoch erreichte dieser Unterschied keine signifikante Ausprägung.



**Abb. 9: Vergleich der Plasma Torque-Teno-Virus (TTV) DNA Area under curve (AUC) für die Tage 0 bis 300 nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) im Hinblick auf die verwendete Graft versus Host Disease (GvHD)-Prophylaxe.** Unterschieden wurden die Gruppen mit einer GvHD Prophylaxe bestehend aus Mycophenolatmofetil (MMF) und Tacrolimus sowie MMF und Cyclosporin A. Jeder Punkt repräsentiert die AUC 0-300 eines einzelnen Patienten. „n“ entspricht der Anzahl der Patienten. „p“ gibt den Signifikanzwert an. Mit einem p-Wert von 0.3 zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Eingezeichnet sind der Median (schwarzer mittlerer Balken) und der Interquartilsabstand (unterer farbiger Balken 25. Interquartilsabstand, oberer farbiger Balken 75. Interquartilsabstand).

Die Mediane der AUC 0-300 wiesen eine in etwa vierfach höhere TT-Viruslast für die Gruppe mit Tacrolimus auf ( $1,75e10 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$  vs  $4,56e9 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) (Abb. 9). Bezogen auf die Mittelwerte zeigten auch hier die Patienten mit Tacrolimus die höhere Gesamt-TTV-DNA-Kopienzahl im Zeitraum von Tag 0 bis 300 nach HSCT. Der Unterschied erreichte mit einem P-Wert von 0,3 jedoch kein signifikantes Ausmaß. Mit einem P-Wert von ebenfalls 0,3 zeigte sich auch bei den Mittelwerten der Peakwerte keine signifikante Differenz zwischen den Gruppen, doch auch hier waren der Gruppe mit Tacrolimus ein anderthalbmal größerer

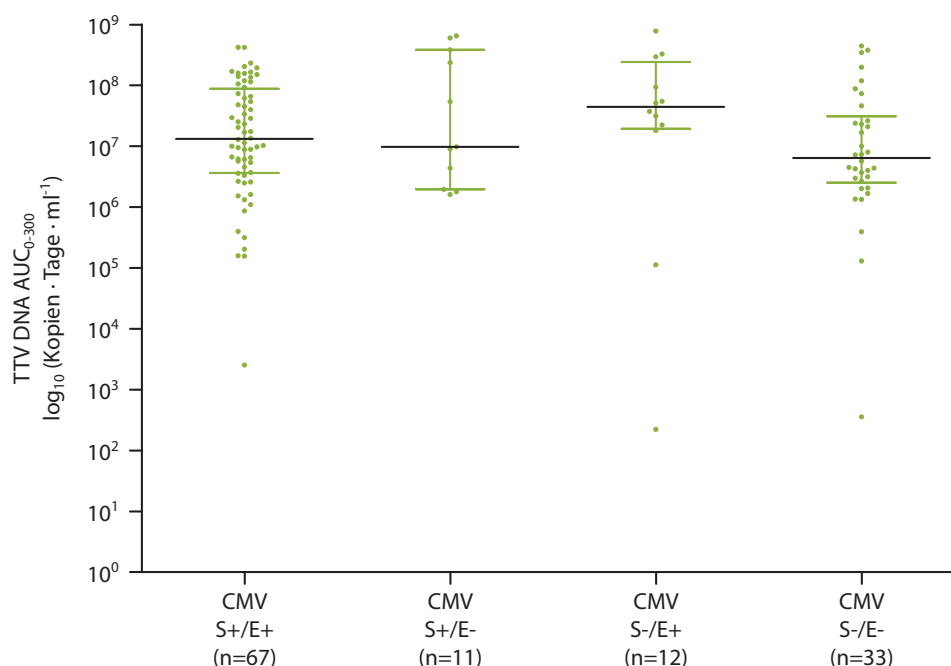
Mittelwert und ein etwa doppelt so großer Median zuzuordnen. So bestand bei allen Gruppenvergleichen ein Trend hin zu höheren Gesamtviruslasten der Gruppe MMF + Tacrolimus, der jedoch zu keiner Zeit signifikant ausgeprägt war.

### 3.8 TT-Viruslast in Abhängigkeit von dem Sender und Empfänger CMV-Serostatus

Verglichen wurde die Torque-Teno-Viruslast von 67 Patienten mit einem Spender und Empfänger IgG positiven CMV-Serostatus (Spender (S) + und Empfänger (E) +), 33 Patienten mit einem Spender und Empfänger IgG negativen CMV-Serostatus (S- E-), 12 Patienten mit einem Spender IgG negativen und einem Empfänger IgG positiven CMV-Serostatus (S- E+) und 11 Patienten mit einem Spender IgG positiven und einem Empfänger IgG negativen CMV-Serostatus (S+ E-).

Für den Gesamtgruppenvergleich der AUC 0-50 Zahlenwerte ließ sich mit einem P-Wert von 0,2 zunächst kein signifikanter Unterschied feststellen. Die Gruppe S+ und E- wies bezogen auf die Mittelwerte die höchste Viruslast im Zeitraum von Tag 0 bis 50 nach HSCT auf und lag damit signifikant oberhalb der TT-Viruslast der Gruppe S - E - ( $p= 0,03$ ). Für den Vergleich der Mittelwerte aller Gruppen der AUC 50-100 war ein signifikanter P-Wert von etwa 0,04 erkennbar. Dabei präsentierten die Gruppen S+ E+ und S+ E- die größte Differenz zueinander – mit einem dreifach höheren Mittelwert der Gruppe S+ E- ( $p= 0,001$ ). Mit einer Differenz von etwas mehr als dem Doppelten und einem P-Wert von 0,03 ließ sich der Unterschied zwischen den Gruppen S+ E+ und S- E+ beschreiben. Wurden die Mediane der AUC 0-300 miteinander verglichen (Abb. 10), stellte sich heraus, dass die Gruppe S- E+ die höchsten Zahlenwerte der AUC 0-300 aufwies. So lag der Median bei  $4,44e7 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup> und damit fast siebenfach über dem Median der Gruppe S- E- mit dem niedrigsten Median von  $6,45e6 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup> im Bereich der ersten 300 Tage nach HSCT. Bereits der Gesamtgruppenvergleich deutete mit einem P-Wert von 0,02 auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen hin. Bei Betrachtung der Mittelwerte zeigte sich, dass hier die Gruppen S+ E- und S- E- am weitesten voneinander entfernt lagen ( $p= 0,03$ ). So wies die Gruppe S+ E- die höchste und die Gruppe S- E- die niedrigste mittlere Viruslast im Beobachtungszeitraum auf. Knapp das Dreifache trennten die Mittelwerte beider Gruppen. Gleichermäßen signifikant präsentierte sich der Gruppenvergleich zwischen S+ E+ vs S- E+ und S+ E+ und S+ E- mit einem P-Wert von aufgerundet 0,005.

Im Rahmen des Vergleiches der Mediane der Peakwerte erwies sich die Gruppe S- E+ als die Gruppe mit dem höchsten Median ( $9,35e5$  Kopien/ml). Damit wurde der Trend, der auch bereits bei der Gegenüberstellung der Mediane im Rahmen des Vergleiches der AUC 50-100 und der AUC 0-300 gesehen werden konnte, auch im vorliegenden Fall bestätigt. Zwischen den Mittelwerten der Peakwerte der einzelnen Gruppen zeigten sich keine signifikanten Größenunterschiede.



**Abb. 10: Vergleich der Plasma Torque-Teno-Virus (TTV) DNA Area under curve (AUC) für die Tage 0 bis 300 nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) im Hinblick auf den Cytomegalievirus (CMV)-Serostatus von Spender und Empfänger.** Unterschieden wurden vier Gruppen: die Gruppe Patienten mit einem Spender (S) und Empfänger (E) IgG positiven CMV-Serostatus (CMV S+/E+), die Gruppe Patienten mit einem Spender IgG positiven und Empfänger IgG negativen CMV-Serostatus (CMV S+/E-), die Gruppe Patienten mit einem Spender IgG negativen und einem Empfänger IgG positiven CMV-Serostatus (CMV S-/E+) und die Gruppe Patienten mit einem Spender und Empfänger IgG negativen CMV-Serostatus (CMV S-/E-). Jeder Punkt repräsentiert die AUC 0-300 eines einzelnen Patienten. „n“ entspricht der Anzahl der Patienten. „p“ gibt den Signifikanzwert an. Mit einem p-Wert von 0.02 zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den vier Gruppen. „-“ steht für CMV IgG negativ. „+“ steht für CMV IgG positiv. Eingezeichnet sind der Median (schwarzer mittlerer Balken) und der Interquartilsabstand (unterer farbiger Balken 25. Interquartilsabstand, oberer farbiger Balken 75. Interquartilsabstand).

### 3.9 TT-Viruslast in Abhängigkeit von dem Verwandtschaftsgrad zwischen Spender und Empfänger

Verglichen wurde die Torque-Teno-Viruslast von 90 Patienten mit einem nicht verwandten Stammzellspender und 33 Patienten mit einem verwandten Stammzellspender. Bei Betrachtung des Gruppenvergleiches der AUC 0-50 fiel auf, dass die mediane TT-Viruslast der Patienten mit einem nicht verwandten Stammzellspender sechsfach höher und der Mittelwert doppelt so hoch ausfiel verglichen mit dem Median und Mittelwert der Patienten mit verwandtem Stammzellspender. Dieser Trend blieb auch im Vergleich der AUC 50-100 Werte zwischen den Gruppen bestehen. Der Median der Gruppe der Patienten, die Stammzellen eines nicht verwandten Spenders erhielten, belief sich auf  $6,10 \times 10^6 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$  und lag damit dreifach oberhalb des Medians der Vergleichsgruppe ( $2,05 \times 10^6 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$ ). Die Mittelwerte beider

Gruppen lagen mit 107 näher beieinander. Wurden die Mediane der AUC 0-300 beider Gruppen miteinander verglichen, zeigte sich auch hier, dass Patienten mit einer Stammzellspende eines nicht Verwandten höhere TT-Viruslasten demonstrierten, die sich im vorliegenden Fall annähernd dreifach über der TT-Viruslast der Patienten mit einer Stammzellspende eines Verwandten befanden ( $1,72e7 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$  vs  $6,06e6 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Die Mittelwerte beider Gruppen trennten weniger als das Anderthalbfache.

Die Mediane der Peakwerte wiesen eine Differenz von mehr als dem Doppelten zueinander auf. Dabei lag der Median der Gruppe mit nicht verwandtem Stammzellspender bei  $4,07e5$  Kopien/ml und der Median der Gruppe mit verwandtem Stammzellspender bei  $1,67e5$  Kopien/ml. Bezogen auf die AUC 0-50, 50-100 und 0-300 wie auch den Peakwerten konnte damit eine eindeutige Tendenz hin zu höheren Zahlenwerten innerhalb der Gruppe der Patienten mit nicht verwandtem Stammzellspender beobachtet werden. Nichtsdestotrotz erreichten diese Unterschiede zu keinem Zeitpunkt ein signifikantes Niveau.

### 3.10 TT-Viruslast in Abhängigkeit von einem TTV-Nachweis vor HSCT

Verglichen wurde die Torque-Teno-Viruslast von 53 Patienten mit TTV-Nachweis (TTV positiv) vor Transplantation und von 53 Patienten mit nicht nachweisbarer TT-Viruslast vor Transplantation (TTV negativ). Überdies wurde die Steigung für jeden Patienten beider Gruppen zwischen dem ersten Tag, an dem die TTV-DNA-Kopienzahl 19 Kopien/ml überschritt, bis zu dem Tag des Erreichens des individuellen Spitzenwertes berechnet. Auf der Grundlage von Intra- und Inter-Assay-Variationsanalysen wurde für diesen internen PCR-Test der Schwellenwert von  $\geq 20$  Kopien/ml festgelegt.

Das Kriterium, anhand dessen entschieden wurde, ob ein Patient als TTV positiv oder TTV negativ eingestuft wurde, lautete: mindestens eine Probe pro Patient musste an Tag 15 vor HSCT oder weiter zurückliegend vorhanden sein und falls in allen verfügbaren Proben vor HSCT keine TTV-DNA-Kopienzahl (Kopienzahl von 0 Kopien/ml oder  $\leq 20$  Kopien/ml) nachweisbar war, so galt dieser Patient als TTV negativ. Umgekehrt bedeutete das: Ein Patient wurde als TTV positiv gewertet, wenn eine Kopienzahl von  $> 20$  Kopien/ml in den untersuchten Proben gemessen wurde. Falls bei einem Patienten nur Proben nach Tag 15 vor HSCT verfügbar gewesen sein sollten, die damit näher an Tag 0 und somit näher am Tag der eigentlichen Transplantation lagen, schied der Patient für diese Einteilung in zwei Gruppen aus. Dadurch sollte verhindert werden, dass die im Rahmen der vor HSCT vollzogene Vortherapie Einfluss auf die TTV-DNA-Kopienzahl nahm. Bei den Patienten, die keiner Gruppe zugeordnet wurden, lag entweder der Fall vor, dass keine Proben von vor HSCT existierten oder nur Proben verfügbar waren, die nach Tag 15 vor der HSCT gewonnen wurden. Einige wenige Fälle erschienen uneindeutig. So konnte bei wenigen Patienten mit vielen und weit zurückreichenden Proben beobachtet werden, dass im



zeitlichen Verlauf Phasen einer TTV-Virämie auftraten, die dann durch Zeitspannen von Wochen bis Monaten abgelöst wurden, in denen im Blut der Patienten keine TTV-DNA-Kopienzahl nachweisbar war. Die Proben waren zweimal auf TTV getestet worden, um Messfehler auszuschließen.

Die Einteilung in TTV positiv und TTV negativ erfolgte unter Vorbehalt, da davon ausgegangen werden musste, dass sich ein Patient zum Zeitpunkt der Probenabnahme entweder in einer virämischen Phase befand oder die Kompetenz des Immunsystems so stark war, dass keine TTV-DNA im Blut der Patienten detektiert werden konnte. Wie bereits in der Einleitung angemerkt, unterliegt TTV einem stetigen Wechsel von hoch produktiver Virusreplikation und einer effektiv ansetzenden antiviralen Immunantwort.

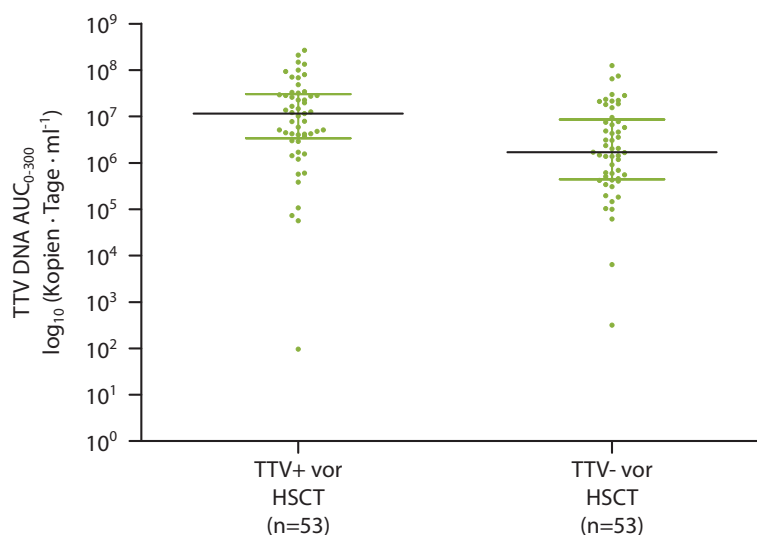
Nach Transplantation konnte in den Proben aller Patienten – unabhängig vom individuellen Ausgangsstatus – TTV-DNA nachgewiesen werden. Der erste Tag des Anstiegs der TTV-DNA-Kopienzahl variierte zwischen den Gruppen. So konnte bei TTV negativen Patienten im Median an Tag 41 nach HSCT ein erster Anstieg der TTV-DNA Kopienzahl mit mehr als 19 Kopien/ml verzeichnet werden. Für die TTV positiven Patienten lag der Median, an denen der erste Anstieg der TTV-DNA-Kopienzahl auf über 19 Kopien/ml auftrat, bei Tag 32 nach HSCT. Damit setzte ein Anstieg innerhalb der Gruppe der TTV Positiven neun Tage früher ein als in der Gruppe der TTV Negativen.

In einem weiteren Schritt wurde unter Berücksichtigung der entsprechenden Gruppenzugehörigkeit die Steigung zwischen dem ersten Tag des Anstieges nach HSCT bis zum Erreichen des Spitzenwertes für jeden einzelnen Patienten berechnet. Für die Patienten, bei denen mindestens zwei Wochen vor Transplantation keine ( $0$  Kopien/ml oder  $\leq 19$  Kopien/ml) TTV-DNA im Plasma detektiert werden konnte, lag die Steigung der TT-Viruslast im Median bei  $7272$  (TTV (Kopien/ml)/Tag). Für die Patienten, bei denen mindestens zwei Wochen vor Transplantation TTV-DNA von mehr als  $19$  Kopien/ml im Plasma detektiert werden konnte, zeigte sich bei dem Median eine Steigung von  $2693$  (TTV (Kopien/ml)/Tag). Die Mediane beider Gruppen unterschied damit annähernd das Dreifache – mit einem steileren Anstieg der Gruppe der TTV Negativen. Auch wenn sich eine Tendenz hin zu einer stärkeren Steilheit bei der Gruppe der TTV Negativen abzeichnete, erreichte diese Beobachtung kein signifikantes Niveau.

Im Vergleich der AUC Werte der ersten 50 Tage nach HSCT wurde ersichtlich, dass die Mediane beider Gruppen zwei Zehnerpotenzen voneinander trennten. So lag der Median der Gruppe der TTV Positiven bei  $2,12e5 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$  und damit 82fach oberhalb des Medians der Gruppe der TTV Negativen, der  $2,57e3 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$  betrug. Das Sechseinhalbfache unterschied die Mittelwerte beider Gruppen, was sich auch in dem hoch signifikanten P-Wert von  $0,0004$  ausdrückte und auch hier der Gruppe der TTV Positiven eine höhere TT-Viruslast zugeordnet werden konnte. Ebenso hoch signifikant ( $p < 0,05$ ) stellte sich der Gruppenvergleich für die AUC 50-100 dar. Der Median der TTV Positiven war eine Zehnerpotenz größer als der



Median der Gruppe der TTV Negativen. Der Mittelwert ( $3,18e7 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) der Gruppe der TTV Positiven belief sich auf das Dreifache des Mittelwertes der TTV Negativen ( $1,03e7 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Werden nun die Zahlenwerte der AUC 0-300 beider Gruppen miteinander verglichen (Abb. 11), so zeigte sich auch hier ein signifikanter Unterschied, der am stärksten im direkten Vergleich der Mediane zu sehen war. Annähernd sechsfach höher stellte sich der Median der Gruppe der TTV Positiven ( $2,61e7 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$  vs  $4,49e6 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) dar. Der Mittelwert der Gruppe der TTV Negativen erreichte ein Drittel des Mittelwertes der Gruppe der TTV Positiven ( $1,13e8 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$  vs  $3,83e7 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Der Vergleich der Peakwerte zeigte, dass auch hier die Mediane beider Gruppen etwa eine Zehnerpotenz auseinander lagen. So befand sich der Median der Gruppe der TTV Positiven ( $7,80e5 \text{ Kopien/ml}$ ) fast neunfach oberhalb des Medians der Gruppe der TTV Negativen ( $8,87e4 \text{ Kopien/ml}$ ).



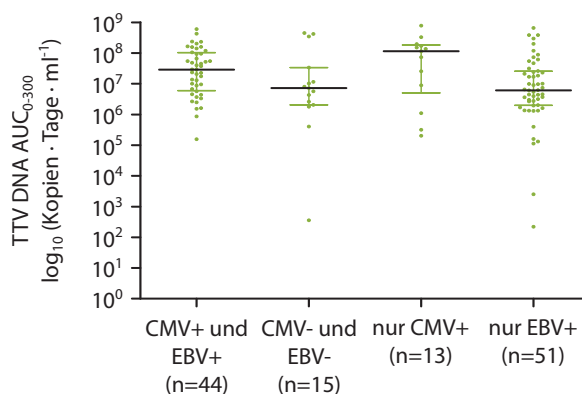
**Abb. 11: Vergleich der Plasma Torque-Teno-Virus (TTV) DNA Area under curve (AUC) für die Tage 0 bis 300 nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) im Hinblick auf den bestehenden TTV Nachweis vor HSCT.** Unterschieden wurden die Gruppen mit einem TTV Nachweis vor HSCT (TTV positiv) und ohne einen TTV Nachweis vor HSCT (TTV negativ). Jeder Punkt repräsentiert die AUC 0-300 eines einzelnen Patienten. „n“ entspricht der Anzahl der Patienten. „p“ gibt den Signifikanzwert an. Mit einem p-Wert von 0.007 zeigt sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit höheren Viruslasten in der Gruppe „TTV+ vor HSCT“. Eingezeichnet sind der Median (schwarzer mittlerer Balken) und der Interquartilsabstand (unterer farbiger Balken 25. Interquartilsabstand, oberer farbiger Balken 75. Interquartilsabstand).

Während innerhalb der Gruppe der TTV Negativen ein steilerer Anstieg zwischen dem ersten Tag, an dem die TTV-DNA-Kopienzahl 19 Kopien/ml überschritt und dem Tag des Spitzenwertes festgestellt werden konnte, lag diese Gruppe hinsichtlich ihrer Zahlenwerte bei der AUC 0-50, 50-100 und 0-300 sowie den Peakwerten unterhalb der Gruppe der TTV Positiven. Die signifikanteste Ausprägung der Größendifferenz zeigte sich in der Gegenüberstellung der Zahlenwerte der AUC 0-50. Aber auch in den sich daran anschließenden Gruppenvergleichen wies die Gruppe der TTV Positiven die signifikant höheren TT-Viruslasten auf.

### 3.11 TT-Viruslast in Abhängigkeit von aufgetretenen Virusreaktivierungen

Verglichen wurde die Torque-Teno-Viruslast von 44 Patienten, die im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nach HSCT eine CMV- und EBV-Reaktivierung entwickelten (CMV und EBV positiv), 15 Patienten, die im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nach HSCT weder eine CMV- noch eine EBV-Reaktivierung entwickelten (CMV und EBV negativ), 13 Patienten, die im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nach HSCT eine alleinige CMV Reaktivierung zeigten (nur CMV positiv) und 51 Patienten, die im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nach HSCT eine alleinige EBV Reaktivierung zeigten (nur EBV positiv).

31 der insgesamt 57 Patienten (54,4%) mit einer CMV-Reaktivierung erhielten eine antivirale Therapie (Valganciclovir (n= 17), Ganciclovir (n= 10), Valaciclovir (n= 2), Tenofovir (n= 1), Aciclovir (n=1). CMV-Reaktivierungen traten zwischen Tag 5 und Tag 294 auf, die CMV-Viruslast lag zwischen 11 - 4330 Kopien/ml (Mittelwert 170 Kopien/ml). EBV-Reaktivierungen wurden zwischen Tag 3 und 313 beobachtet, und die Viruslast belief sich auf 195 bis 7620 Kopien/ml.



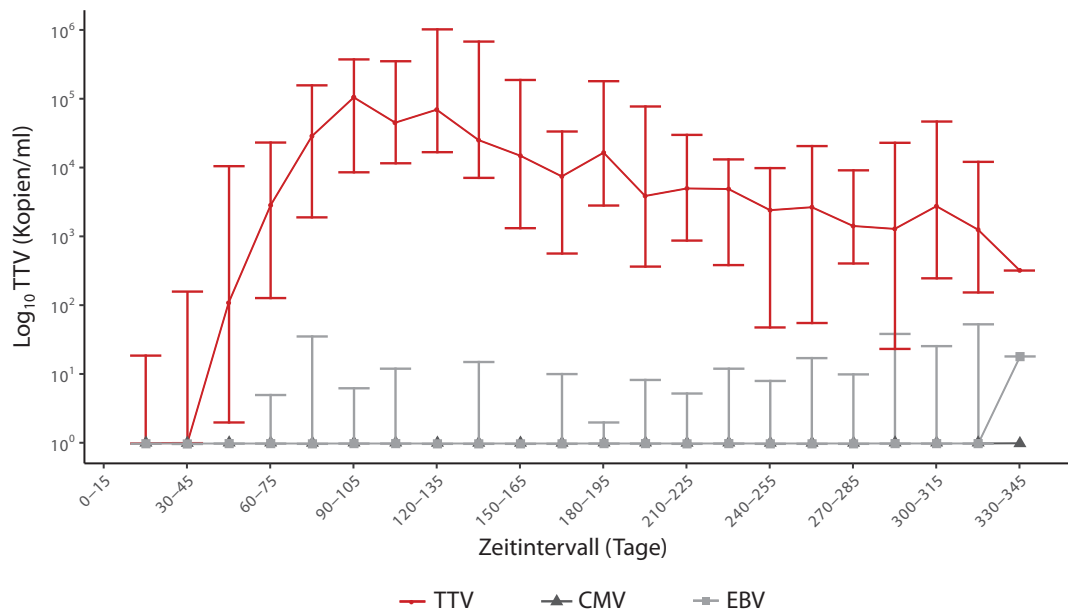
**Abb. 12: Vergleich der Plasma Torque-Teno-Virus (TTV) DNA Area under curve (AUC) für die Tage 0 bis 300 nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) im Hinblick auf aufgetretene Virusreaktivierungen im Zeitraum von 300 Tagen nach HSCT.** Verglichen wurden vier Gruppen: die Gruppe Patienten mit einer Cytomegalievirus (CMV)- und Epstein-Barr-Virus (EBV)-Reaktivierung (CMV positiv (+) EBV+), die Gruppe Patienten ohne CMV- und EBV-Reaktivierung (CMV negativ (-) EBV-), die Gruppe Patienten mit alleiniger CMV-Reaktivierung (nur CMV+) und die Gruppe Patienten mit alleiniger EBV-Reaktivierung (nur EBV+). Jeder Punkt repräsentiert die AUC 0-300 eines einzelnen Patienten. „n“ entspricht der Anzahl der Patienten. „p“ gibt den Signifikanzwert an. Mit einem p-Wert von 0.1 zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den vier Gruppen. Eingezeichnet sind der Median (schwarzer mittlerer Balken) und der Interquartilsabstand (unterer farbiger Balken 25. Interquartilsabstand, oberer farbiger Balken 75. Interquartilsabstand).

Für den Vergleich der AUC 0-50 Werte war zu erkennen, dass die Gruppe der CMV und EBV Negativen in den ersten 50 Tagen nach HSCT im Median die höchste Viruslast im Vergleich zu den Gruppen mit positiver CMV- und/oder EBV-Reaktivierung aufwies. So lag der Median der

Gruppe der CMV und EBV Negativen mit  $1,31e5 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$  13fach oberhalb des Medians der Gruppe der nur EBV positiven Patienten, die mit  $9,77e3 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$  den niedrigsten Median im Gruppenvergleich der AUC 0-50 besaßen. Mit einem P-Wert von 0,5 erreichten die Unterschiede zwischen den Gruppen kein signifikantes Ausmaß. Bei Betrachtung der Mediane der einzelnen Gruppen für die AUC 50-100 zeigte sich ein anderes Bild. Hier war der höchste Median der Gruppe mit alleiniger CMV-Reaktivierung zuzuordnen. Mit einem Median von  $\log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$  erwies sich dieser als achtfach höher verglichen mit dem Median der Gruppe mit alleiniger EBV-Reaktivierung von  $2,72e6 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$ . Zeigte sich bereits im Gesamtgruppenvergleich kein signifikanter P-Wert, verhielt es sich auch bei den einzelnen P-Werten der Gruppen für die AUC 50-100 untereinander nicht anders. Ein P-Wert von 0,1 für den Gesamtgruppenvergleich der AUC 0-300 deutete in Richtung eines signifikanten Unterschiedes zwischen den Gruppen der AUC 0-300 hin (Abb. 12). Im direkten Vergleich zeigte sich zwischen den Gruppen der nur CMV Positiven und nur EBV Positiven mit einem P-Wert von 0,0253 ein signifikanter Unterschied. Dabei konnte der Median der Gruppe nur CMV positiv getesteten Patienten mit  $1,15e8 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$  um zwei Zehnerpotenzen knapp 19fach höher eingeordnet werden als der Median der Gruppe nur EBV positiv getesteten Patienten ( $6,11e6 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$ ). Auch bei den Mittelwerten erzielte die Gruppe der nur CMV positiv getesteten Patienten die höchsten Viruslasten und wies gegenüber der Gruppe der nur EBV positiv getesteten Patienten die stärkste Größendifferenz auf. Dabei belief sich der Mittelwert der Gruppe der nur CMV Positiven mit  $1,53e8 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$  das Dreifache des Mittelwertes der Gruppe der nur EBV Positiven ( $5,10e7 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$ ). Für den Vergleich der Peakwerte war festzuhalten: Die Gruppe „nur CMV positiv“ lag mit einem Median von  $1,40e6$  Kopien/ml eine Zehnerpotenz oberhalb der Mediane der Vergleichsgruppen. Den Median der Gruppe „nur CMV positiv“ und den Median der Gruppe „nur EBV positiv“ trennte in etwa das Zehnfache mit einem zehnmal höheren Median der Gruppe „nur CMV positiv“. Bezogen auf die Mittelwerte wies auch hier die Gruppe der nur CMV positiven Patienten den größten Zahlenwert mit  $1,64e6$  Kopien/ml auf. Der geringste Zahlenwert der Mittelwerte konnte mit  $7,54e5$  Kopien/ml der Gruppe der nur EBV positiven Patienten zugeordnet werden, der damit nur halb so groß war wie der Mittelwert der Gruppe der nur CMV positiven Patienten. Dieser Unterschied erreichte ein signifikantes Ausmaß ( $p= 0,03$ ). Die Gruppen „CMV positiv EBV positiv“ und „nur EBV positiv“ trennte weniger als das Doppelte. Auch hier zeigte sich eine signifikante Differenz der Zahlenwerte beider Gruppen ( $p= 0,04$ ).

Zusammenfassend war festzuhalten, dass bei Betrachtung der Mediane der AUC 50-100, 0-300 und der Peakwerte die Gruppe „nur CMV positiv“ die größten Zahlenwerte aufzeigte. Für die AUC 0-300 und die Peakwerte blieb dieses Bild auch für die Mittelwerte bestehen. Überdies war zu beobachten, dass die Gruppe „nur EBV positiv“ bezogen auf die Mediane die geringsten Zahlenwerte aufwies.

Wie Abbildung 13 zu entnehmen ist, wirkte die Entwicklung der TT-Viruslast über die Zeit losgelöst von möglichen Reaktivierungen des CMV und EBV. Bei Betrachtung der medianen Viruslasten der CMV- und EBV-Reaktivierungen fiel auf, dass diese durchgehend auf einem unteren Zahlenniveau angesiedelt waren.



**Abb. 13:** Übersichtgraph der Entwicklung der Torque-Teno-Virus (TTV)-Last der 123 Patienten zwischen Tag 0 bis 345 nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) (rot dargestellt) und Übersichtgraph der Cytomegalievirus (CMV)- und Epstein-Barr-Virus (EBV)-Last zwischen Tag 0 bis 345 nach HSCT (grau dargestellt). Die Punkte, Dreiecke und Quadrate repräsentieren die Mediane, die aus den vorhandenen Viruslasten aller Patienten in den jeweils betrachteten Zeiträumen von 15 Tagen gebildet wurden. Eingezeichnet sind überdies der 25. Interquartilsabstand (unterer Balken) und der 75. Interquartilsabstand (oberer Balken).

### 3.12 TT-Viruslast in Abhängigkeit von Virusreaktivierungen $\geq 1000$ Kopien/ml

Die meisten Patienten zeigten eine Viruslast von weniger als 1000 Kopien/ml ( $n=93$ ). Eine Untergruppe von Patienten verzeichnete eine hochgradige Virämie mit Viruslasten von  $\geq 1000$  Kopien/ml ( $n=30$ ). Wir ermittelten hohe Viruslasten bei Patienten mit Virusreaktivierungen von: EBV und BK ( $n=4$ ), CMV und BK ( $n=1$ ), BK ( $n=14$ ), EBV ( $n=5$ ), CMV ( $n=4$ ), Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV1) und BK ( $n=1$ ), und mit humanem Herpesvirus Typ 6 (HHV6) ( $n=1$ ). Verglichen wurde daher die Torque-Teno-Viruslast von 93 Patienten, die eine Virusreaktivierung von weniger als 1000 Kopien/ml entwickelten ( $VR < 1000$  Kopien/ml) und von

30 Patienten mit einer Virusreaktivierung von mindestens 1000 Kopien/ml ( $VR \geq 1000$  Kopien/ml).

Die Mediane für die Zahlenwerte der AUC 0-50 der Gruppen  $VR < 1000$  Kopien/ml und  $VR \geq 1000$  Kopien/ml befanden sich annähernd auf einem Zahlenniveau. Dennoch war eine Tendenz hin zu einer anfänglich höheren Viruslast bei den Patienten mit einer Virusreaktivierung von mindestens 1000 Kopien/ml zu erkennen ( $p > 0,05$ ). Wurden die Mittelwerte beider Gruppen miteinander verglichen, war festzustellen, dass hier die mittlere Viruslast der ersten 50 Tage nach HSCT innerhalb der Gruppe  $VR < 1000$  Kopien/ml mit  $3,45e6 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$  mehr als doppelt so hoch ausfiel wie die mittlere Viruslast der Gruppe  $VR \geq 1000$  Kopien/ml mit  $1,15e6 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$ . Mit einem Median von  $6,33e6 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$  der Gruppe  $VR \geq 1000$  Kopien/ml für den Zeitraum von Tag 50 bis 100 nach HSCT zeigte sich verglichen mit einem Median von  $4,57e6 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$  der Gruppe  $VR < 1000$  Kopien/ml für den gleichen Zeitraum eine leichte Verlagerung der höheren Zahlenwerte hin zu der Gruppe  $VR \geq 1000$  Kopien/ml. Vergleichbar zu den Erkenntnissen des Gruppenvergleiches für die AUC 0-50 war auch bei dem Gruppenvergleich für die AUC 50-100 festzustellen, dass die Mittelwerte der Gruppe  $VR < 1000$  Kopien/ml höher lagen als die Mittelwerte der Gruppe  $VR \geq 1000$  Kopien/ml ( $p > 0,05$ ). Für den Gruppenvergleich der AUC 0-300 war festzuhalten, dass hier der Median der Gruppe  $VR \geq 1000$  Kopien/ml ( $3,72e7 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$ ) mehr als das Dreifache des Medians der Gruppe  $VR < 1000$  Kopien/ml ( $9,78e6 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$ ) betrug. Bezogen auf die Mittelwerte war bei der AUC 0-300 erstmalig zu beobachten, dass auch hier die Gruppe  $VR \geq 1000$  Kopien/ml im Mittel höhere Zahlenwerte aufwies als die Gruppe  $VR < 995$  Kopien/ml ( $p > 0,05$ ). Der Median des Peakwertes der Gruppe  $VR \geq 1000$  Kopien/ml ( $7,99e5$  Kopien/ml) befand sich mehr als dreifach oberhalb des Medians der Gruppe  $VR < 1000$  Kopien/ml ( $2,47e5$  Kopien/ml) und auch der Mittelwert der Gruppe  $VR \geq 1000$  Kopien/ml war in diesem Fall höher als der Mittelwert der Gruppe  $VR < 1000$  Kopien/ml.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass eine Virusreaktivierung  $\geq 1000$  Kopien/ml mit einer höheren Viruslast assoziiert war. Dabei lag der Median der Gruppe  $VR \geq 1000$  Kopien/ml durchweg oberhalb des Medians der Gruppe  $VR < 1000$  Kopien/ml. Die Mittelwerte der Gruppe  $VR \geq 1000$  Kopien/ml für die AUC 0-300 und die Peakwerte erwiesen sich ebenfalls höher gelegen als die Mittelwerte der Gruppe  $VR < 1000$  Kopien/ml des gleichen Zeitraums. Zu keinem Zeitpunkt erreichte der Vergleich der Zahlenwerte beider Gruppen signifikante Ausprägungen ( $p > 0,05$ ).

In einem zweiten Schritt wurde überprüft, wie oft Fälle einer akuten GvHD  $\geq$  Grad II innerhalb des Kollektivs der Patienten mit einer Virusreaktivierung von  $\geq 1000$  Kopien/ml auftraten. Von den 30 Patienten mit einer Virusreaktivierung von  $\geq 1000$  Kopien/ml erlitten sieben Patienten eine akute GvHD  $\geq$  Grad II und sechs Patienten neben einer akuten GvHD  $\geq$  Grad II zusätzlich noch ein Rezidiv. Anschließend wurde verglichen, wie sich die AUC Zahlenwerte der TT-Viruslast basierend auf dem Kollektiv der Patienten mit einer stark ausgeprägten Virusreaktivierung von

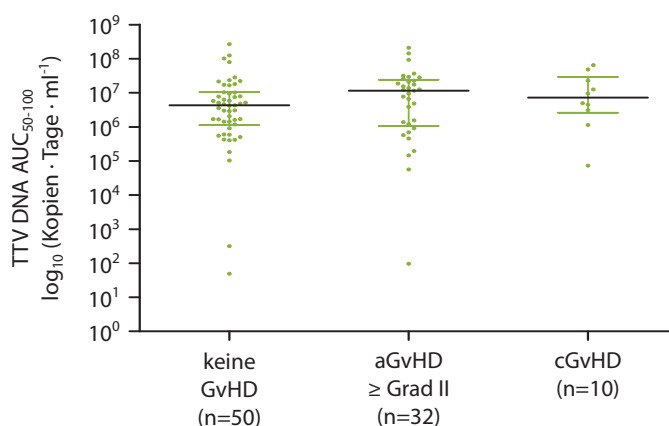
$\geq 1000$  Kopien/ml verhielten, in Abhängigkeit davon, ob es zu der Entwicklung einer akuten GvHD  $\geq$  Grad II kam oder nicht.

Insgesamt zeigte sich dabei ein nicht ganz eindeutiges Bild. Bezogen auf die mittlere TT-Viruslast unter den Patienten mit einer Virusreaktivierung von  $\geq 1000$  Kopien/ml lag die Gruppe der Patienten ohne aGvHD mit ihren Zahlenwerten durchweg oberhalb der Gruppe der Patienten mit einer aGvHD  $\geq$  Grad II. Bei Betrachtung der Mediane der AUC 0-50 und 50-100 fiel auf, dass hier die Gruppe der Patienten mit einer aGvHD  $\geq$  Grad II eine größere Viruslast aufwies.

### 3.13 TT-Viruslast in Abhängigkeit von aufgetretenen Abstoßungsreaktionen

Verglichen wurde die Torque-Teno-Viruslast von 50 Patienten, die im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nach HSCT keine *Graft versus Host Disease* entwickelten, sowie von 32 Patienten, bei denen eine akute *Graft versus Host Disease* mindestens Grad II (aGvHD  $\geq$  Grad II) auftrat und von 10 Patienten, die eine chronische *Graft versus Host Disease* (cGvHD) erlitten. Wurden die Mediane der drei Gruppen für die AUC 0-50 miteinander verglichen, fiel auf, dass der Median der Gruppe mit einer cGvHD eine Zehnerpotenz oberhalb der Mediane der Vergleichsgruppen lag ( $1,38e5 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$  für die Gruppe mit einer cGvHD vs  $2,07e4 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$  für die Gruppe mit einer aGvHD  $\geq$  Grad II vs  $2,86e4 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$  für die Gruppe ohne GvHD).

Wurden die Mediane der AUC 50-100 der einzelnen Gruppen gegenübergestellt (Abb. 14), zeigte sich ein anderes Bild als es bei der Betrachtung der Mediane der AUC 0-50 der Fall war. Hier wies die Gruppe mit einer aGvHD  $\geq$  Grad II den höchsten Median mit  $1,15e7 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$  auf. Mehr als zweieinhalbmal größer war der Median der Gruppe mit einer aGvHD  $\geq$  Grad II im Vergleich zum Median der Gruppe ohne GvHD ( $4,30e6 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$ ) und etwa anderthalb mal größer als der Median der Gruppe mit einer cGvHD ( $7,23e6 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$ ). Auch der Vergleich der Mittelwerte für die AUC 50-100 legte dar, dass die größeren Zahlenwerte der Gruppe mit einer aGvHD  $\geq$  Grad II angehörten. Die Mittelwerte der Gruppen ohne und mit einer cGvHD lagen im Bereich von Tag 50 bis 100 nach HSCT sehr nahe beieinander. Wurden die drei Gruppen untereinander auf Signifikanzen untersucht und die P-Werte für die einzelnen Gruppenvergleiche ermittelt, ließ sich – wie auch bereits bei der AUC 0-50 – kein signifikanter Unterschied finden. In einem weiteren Schritt wurde die über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg berechnete Gesamtviruslast – ausgedrückt in der AUC 0-300 – der einzelnen Patientengruppen miteinander verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass in der Gegenüberstellung der Mediane wie auch der Mittelwerte die Gruppe mit einer aGvHD  $\geq$  Grad II den höchsten Median für die AUC 0-300 zeigte. Dieser war fast doppelt so hoch wie der Median der Gruppe ohne GvHD und befand sich annähernd anderthalbmal über



**Abb. 14:** Vergleich der Plasma Torque-Teno-Virus (TTV) DNA Area under curve (AUC) für die Tage 50 bis 100 nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) im Hinblick auf eine aufgetretene Graft versus Host Disease (GvHD) im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nach HSCT. Verglichen wurden drei Gruppen: die Gruppe Patienten ohne die Entwicklung einer GvHD (keine GvHD), die Gruppe Patienten mit der Entwicklung einer akuten GvHD mindestens Grad II (aGvHD  $\geq$  Grad II) und die Gruppe Patienten mit der Entwicklung einer chronischen GvHD (cGvHD). Jeder Punkt repräsentiert die AUC 50-100 eines einzelnen Patienten. „n“ entspricht der Anzahl der Patienten. „p“ gibt den Signifikanzwert an. Mit einem p-Wert von 0.8 zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen. Eingezeichnet sind der Median (schwarzer mittlerer Balken) und der Interquartilsabstand (unterer farbiger Balken 25. Interquartilsabstand, oberer farbiger Balken 75. Interquartilsabstand).

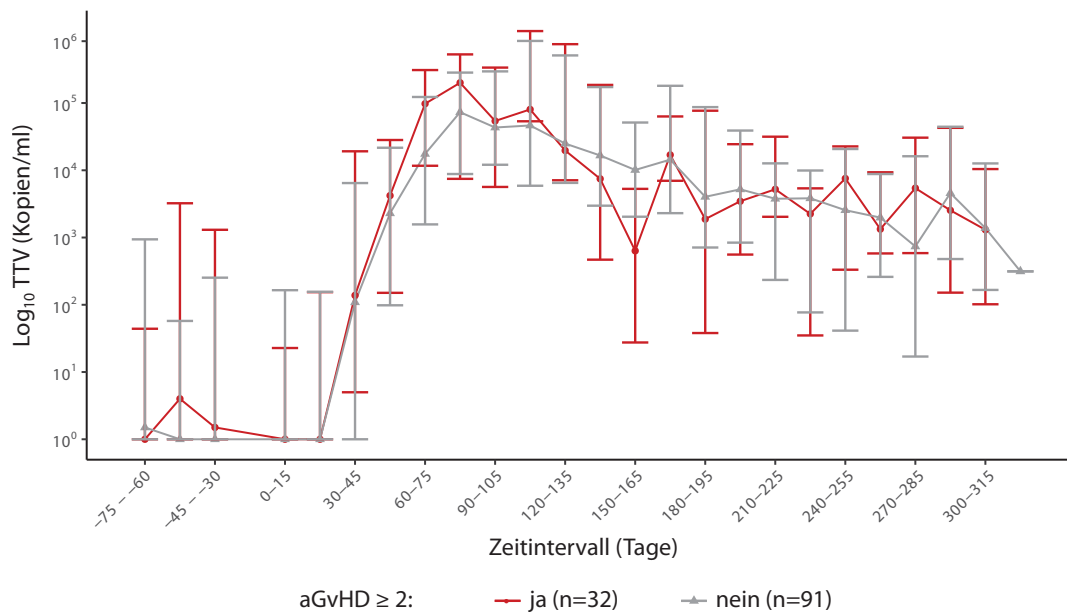
dem Median der Gruppe mit einer cGvHD. Mehr als das Doppelte trennte den Mittelwert der Gruppe mit einer aGvHD  $\geq$  Grad II ( $7,85e7 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>) von dem Mittelwert der Gruppe mit einer cGvHD ( $3,56e7 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>) und etwa anderthalbmal kleiner stellte sich der Mittelwert der Gruppe ohne GvHD ( $5,56e7 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>) im Vergleich zu dem Mittelwert der Gruppe mit einer aGvHD  $\geq$  Grad II dar. Wurden auch für die Gruppen untereinander die P-Werte berechnet, ließen sich auch für die AUC 0-300 keine Signifikanzen erkennen (P-Wert für die Gruppen ohne GvHD und mit aGvHD  $\geq$  Grad II: 0,4; P-Wert für die Gruppen ohne GvHD und mit cGvHD: 0,6 und P-Wert für die Gruppen mit aGvHD  $\geq$  Grad II und mit cGvHD: 0,4). Für den Vergleich der Peakwerte konnte auf den bisherigen Beobachtungen aufgebaut werden. Median und Mittelwert für die Spitzenwerte der Gruppe mit einer aGvHD  $\geq$  Grad II wiesen auch hier verglichen mit der Gruppe ohne und mit einer cGvHD die höheren Zahlenwerte auf. Wie der P-Wert des Gesamtgruppenvergleiches mit 0,9 vermuten ließ, zeigten sich auch zwischen diesen Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

Damit galt es festzuhalten, dass die Gruppe mit einer cGvHD im Zeitraum von 300 Tagen nach HSCT im Median und im Mittel die höchste Gesamtviruslast für die AUC 0-50 aufweist. Bei der AUC 50-100, 0-300 und bei den Peakwerten zeigt sich, dass für Median und Mittelwert der Gruppe mit einer aGvHD  $\geq$  Grad II höhere Zahlenwerte auftreten.

Wurden nun die Steigungswerte der Patienten betrachtet, die im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nach HSCT eine aGvHD entwickelten und wurden sie mit den Steigungswerten der



Patienten verglichen, die keine aGvHD ausbildeten, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Dennoch lag der Median der Steigung der Gruppe mit einer aGvHD ( $1,64e3$  (TTV DNA Kopien/ml/Tag)) zweifach oberhalb des Medians der Steigung der Gruppe ohne eine aGvHD ( $7,61e2$  (TTV DNA Kopien/ml)/Tag)). Die Unterschiede der Mittelwerte beider Gruppen waren geringfügiger. Sie trennte weniger als das Anderthalbfache, doch auch hier wiesen Patienten mit einer aGvHD einen stärkeren mittleren Anstieg innerhalb der ersten 110 Tage nach HSCT auf. Somit zeigte sich ein Trend hin zu einem stärkeren Anstieg der TT-Viruslast innerhalb der Gruppe mit einer aGvHD, der allerdings kein signifikantes Ausmaß erreichte.



**Abb. 15:** Übersichtsgraph der Entwicklung der Torque-Teno-Virus (TTV)-Last zwischen Tag 75 vor bis Tag 315 nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) im Hinblick auf die Entwicklung einer akuten Graft versus Host Disease (GvHD) im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nach HSCT. Verglichen wurden die Gruppen mit (rot dargestellt) und ohne (grau dargestellt) Auftreten einer akuten GvHD mindestens Grad II (aGvHD  $\geq$  Grad II). Die Punkte repräsentieren die Mediane, die aus den vorhandenen Viruslasten aller Patienten in den jeweils betrachteten Zeiträumen von 15 Tagen gebildet wurden. Eingezeichnet sind überdies der 25. Interquartilsabstand (unterer Balken) und der 75. Interquartilsabstand (oberer Balken).

In Abbildung 15 ist dargestellt, wie sich die reine Viruslast der Patienten beider Gruppen im zeitlichen Verlauf darstellte. Dabei war kein eindeutiger Trend erkennbar. Insgesamt zeigten sich die Kurven beider Gruppen nahezu deckungsgleich – das heißt, es waren keine größeren Unterschiede zwischen den reinen Viruslasten beider Gruppen zu verzeichnen.



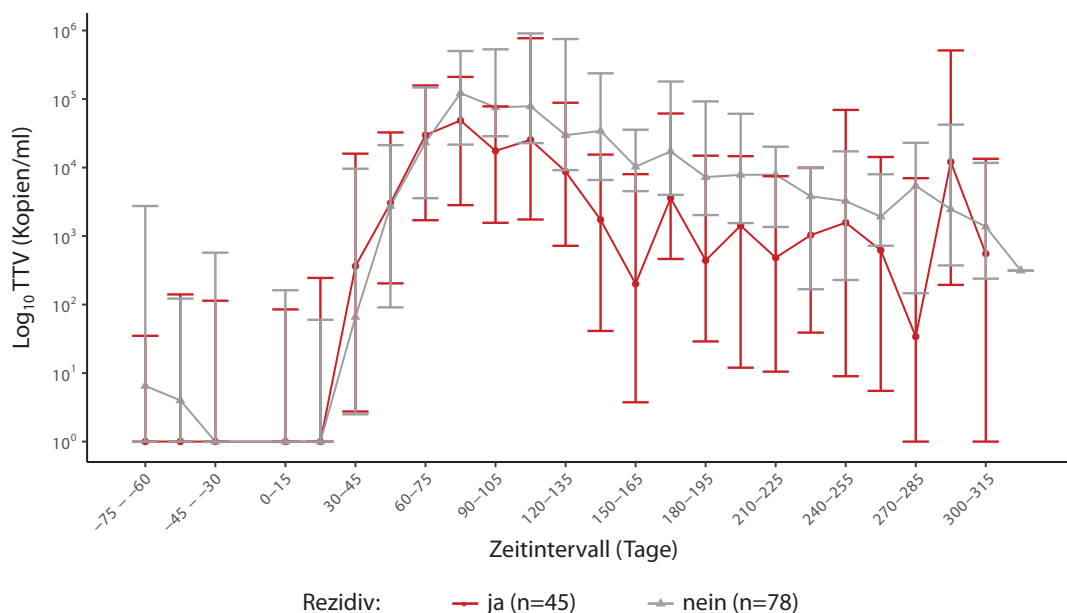
### 3.14 TT-Viruslast in Abhängigkeit von dem Auftreten eines Rezidivs

Verglichen wurde die Torque-Teno-Viruslast von 45 Patienten, die im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nach HSCT ein Rezidiv entwickelten und von 78 Patienten, die im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nach HSCT kein Rezidiv entwickelten. Die Mediane für die AUC 0-50 der Gruppen mit Rezidiv und ohne Rezidiv befanden sich auf einem vergleichbaren Zahlenniveau. Dabei belief sich der Median der Gruppe mit Rezidiv auf  $2,30e4 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml<sup>-1</sup> und lag damit unterhalb des Medians der Gruppe Patienten ohne Rezidiv mit  $2,80e4 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>. Die Differenz zwischen den Mittelwerten beider Gruppen war gering, aber auch hier konnte beobachtet werden, dass die Gruppe mit Rezidiv im Mittel niedrigere Zahlenwerte aufwies. Insgesamt war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen feststellbar. Sowohl zwischen den Medianen als auch zwischen den Mittelwerten für die AUC 50-100 der Gruppen der Patienten mit Rezidiv und ohne Rezidiv konnte ein Unterschied von weniger als dem Anderthalbfachen gesehen werden. In beiden Fällen waren die geringeren Zahlenwerte der Gruppe mit Rezidiv zuzuordnen. Für die AUC 0-300 konnte aufgedeckt werden, dass - wie auch bei der AUC 0-50 und 50-100 - der Median und der Mittelwert der Gruppe der Patienten mit Rezidiv unterhalb des Medians und Mittelwertes der Gruppe der Patienten ohne Rezidiv lag. Der Median der Gruppe ohne Rezidiv befand sich mit  $1,36e7 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml<sup>-1</sup> anderthalbmal höher als der Median der Gruppe mit Rezidiv mit  $8,89e6 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>. Auch die Spitzenwerte im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nach HSCT der einzelnen Gruppen wurden miteinander verglichen. Der Median der Gruppe ohne Rezidiv ( $3,37e5$  Kopien/ml) war anderthalbmal größer als der Median der Gruppe mit Rezidiv ( $2,38e5$  Kopien/ml). Der Mittelwert der Gruppe Patienten mit Rezidiv lag mit  $1,14e6$  Kopien/ml graduell höher als der Mittelwert der Gruppe Patienten ohne Rezidiv mit  $1,08e6$  Kopien/ml.

Zusammenfassend konnte damit aufgedeckt werden, dass durchgängig eine Tendenz hin zu niedrigeren Zahlenwerten der Mediane und Mittelwerte innerhalb der Gruppe Patienten mit Rezidiv bestand. Die Unterschiede im direkten Vergleich mit der Gruppe der Patienten ohne Rezidiv erreichten allerdings keine signifikanten Ausmaße ( $p > 0,05$ ).

Der Vergleich der Steilheit des Anstieges beider Gruppen miteinander ergab, dass Patienten ohne Rezidiv im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nach HSCT im Median eine Steigung von  $1,05e3$  ((TTV DNA Kopien/ml)/Tag) erkennen ließen. Damit lag der Median der Steigung zweifach höher als der Median der Gruppe mit Rezidiv ( $4,96e2$  (TTV DNA Kopien/ml)/Tag). Es fand sich auch eine Tendenz hin zu einer höheren mittleren Steigung der Gruppe der Patienten ohne Rezidiv ( $6,70e3$  (TTV DNA Kopien/ml)/Tag) verglichen mit der Gruppe der Patienten mit Rezidiv ( $5,85e3$  (TTV DNA Kopien/ml)/Tag).

Wurde neben den AUC Zahlenwerten und der Steigung auch die Entwicklung der reinen TT-Viruslast aller Patienten über die Zeit als Vergleichsmedium herangezogen, zeigte sich im graphi-



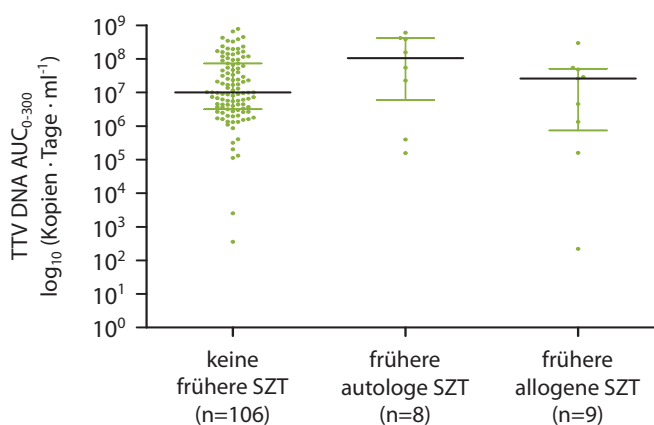
**Abb. 16:** Übersichtsgraph der Entwicklung der Torque-Teno-Virus (TTV)-Last zwischen Tag 75 vor bis Tag 315 nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) im Hinblick auf die Entwicklung eines Rezidivs im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nach HSCT. Verglichen wurden die Gruppen mit (rot dargestellt) und ohne (grau dargestellt) Rezidiv. Die Punkte repräsentieren die Mediane, die aus den vorhandenen Viruslasten aller Patienten in den jeweils betrachteten Zeiträumen von 15 Tagen gebildet wurden. Eingezeichnet sind überdies der 25. Interquartilsabstand (unterer Balken) und der 75. Interquartilsabstand (oberer Balken).

schen Verlauf ebenfalls ein Trend hin zu niedrigeren Viruslasten der Patienten mit Entwicklung eines Rezidivs (Abb. 16). Ein sichtbarer Unterschied beider Kurven war allerdings erst ab etwa Tag 100 nach HSCT zu erkennen. Abgesehen von dem nach oben hin abweichenden Ausreißer etwa 300 Tage nach HSCT verlief die Kurve der TT-Viruslast der Patienten mit Rezidiv durchgängig unterhalb der TT-Viruslast der Patienten ohne Rezidiv.

### 3.15 TT-Viruslast in Abhängigkeit von früheren Stammzelltransplantationen

Verglichen wurde die Torque-Teno-Viruslast von 106 Patienten, die im Vorfeld der aktuellen HSCT noch nicht stammzelltransplantiert wurden (keine frühere SZT), von 8 Patienten, die im Vorfeld der aktuellen HSCT bereits autolog stammzelltransplantiert wurden (frühere autologe SZT) und von 9 Patienten, die im Vorfeld der aktuellen HSCT bereits allogene stammzelltransplantiert wurden (frühere allogene SZT). Wurden die Zahlenwerte der AUC 0-50 einander gegenübergestellt, zeigte sich, dass der Median der Gruppe ohne frühere SZT mit  $2,91e4 \log_{10} \text{Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$  annähernd doppelt so groß war wie die Mediane der Gruppen mit früherer

autologer ( $1,50e4 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) oder allogener ( $1,51e4 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) SZT. Der Vergleich der Mittelwerte offenbarte, dass hier die Gruppe mit früherer allogener SZT eine um zwei Zehnerpotenzen höhere mittlere Viruslast für die ersten 50 Tage nach HSCT aufwies. Im Gesamtgruppenvergleich konnte ein P-Wert von 0,3 erzielt werden, der damit nicht signifikant ausfiel. Auch zwischen den Gruppen ergaben sich für die AUC 0-50 keine signifikanten Differenzen. Für die AUC 50-100 Zahlenwerte war zu beobachten, dass der Median der Gruppe mit früherer autologer SZT mit  $1,51e7 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$  eine Zehnerpotenz oberhalb der Mediane der Vergleichsgruppen lag. Auch für die Mittelwerte der AUC 50-100 war festzuhalten, dass in der Gruppe der zuvor bereits autolog Stammzelltransplantierten im Mittel die höheren Viruslasten ermittelt werden konnten. Bei Überprüfung der Gruppen untereinander auf statistisch signifikante Unterschiede ließen sich keine Signifikanzen feststellen. Die Gegenüberstellung AUC 0-300 ergab (Abb. 17) signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Die Zahlenwerte der Gruppe mit früherer autologer SZT grenzten sich hoch signifikant von den Zahlenwerten der Gruppe ohne frühere SZT ab. Dies verdeutlichte der P-Wert von 0.008 zwischen den Gruppen. Median und Mittelwert der Gruppe mit vorausgegangener autologer SZT wiesen in beiden Fällen größere Zahlenwerte auf als die Vergleichsgruppen. Mit  $1,06e8 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$  lag der Median der Gruppe mit früherer autologer SZT zehneinhalbmals höher als der Median der Gruppe ohne vorausgegangene SZT ( $9,99e6 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) und viermal höher als der Median der Gruppe mit früherer allogener SZT ( $2,61e7 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ).



**Abb. 17: Vergleich der Plasma Torque-Teno-Virus (TTV) DNA Area under curve (AUC) für die Tage 0 bis 300 nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) im Hinblick auf vorausgegangene Stammzelltransplantationen (SZT).** Verglichen wurden drei Gruppen: die Gruppe ohne vorausgegangene SZT (keine frühere SZT), die Gruppe mit einer vorausgegangenen autologen SZT (frühere autologe SZT) oder die Gruppe mit einer vorausgegangenen allogenen SZT (frühere allogene SZT). Jeder Punkt repräsentiert die AUC 0-300 eines einzelnen Patienten. „n“ entspricht der Anzahl der Patienten. „p“ gibt den Signifikanzwert an. Mit einem p-Wert von 0.02 zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen. Eingezeichnet sind der Median (schwarzer mittlerer Balken) und der Interquartilsabstand (unterer farbiger Balken 25. Interquartilsabstand, oberer farbiger Balken 75. Interquartilsabstand).

In einem weiteren Schritt wurden die Spitzenwerte der einzelnen Gruppen verglichen, die im Gesamtbeobachtungszeitraum von 300 Tagen gefunden wurden. Der Median von  $2,85e6$  Kopien/ml

für die Gruppe mit früherer autologer SZT war zehnmal größer als der Median der Gruppe ohne frühere SZT ( $2,66e5$  Kopien/ml) und vierfach größer als der Median der Gruppe mit früherer allogener SZT ( $7,07e5$  Kopien/ml). Der Gruppenvergleich zwischen den zuvor noch nicht stammzelltransplantierten Patienten und den zuvor autolog stammzelltransplantierten erreichte mit einem P-Wert von 0.0236 ein signifikantes Ausmaß. Zwischen den anderen Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

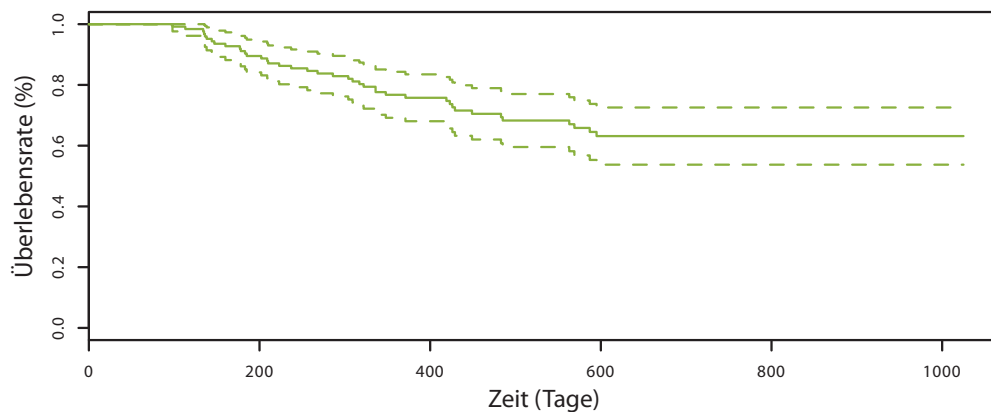
Zusammenfassend ergab sich innerhalb der ersten 50 Tage noch kein eindeutiges Bild. Der Vergleich der Gesamtviruslasten für den Zeitraum von Tag 50 bis 100 zeigte dann aber den Trend, dass sowohl der Median als auch der Mittelwert der Gruppe der im Vorfeld bereits autolog stammzelltransplantierten Patienten oberhalb der Mediane und Mittelwerte der Vergleichsgruppen lagen. Signifikante Ausprägungen erreichte der Vergleich der Gruppen ohne frühere und mit früherer autologer HSCT für die AUC 0-300 sowie für die Peakwerte.

### 3.16 TT-Viruslast in Abhängigkeit von dem Ausgang

Verglichen wurde die Torque-Teno-Viruslast von 83 Patienten, die bis September 2018 noch am Leben waren und von 40 Patienten, die bis September 2018 bereits verstorben waren. Wurden die Mediane für die AUC 0-50 der Gruppen Überlebende und Verstorbene miteinander verglichen, war zu erkennen, dass der Median der Gruppe der Verstorbenen mit  $3,37e4 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml<sup>-1</sup> anderthalbmal über dem Median der Gruppe der Überlebenden mit  $2,26e4 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml<sup>-1</sup> lag. Die mittleren Werte beider Gruppen zeigten aber die Tendenz hinzu höheren anfänglichen Viruslasten innerhalb der Gruppe der Überlebenden, wenngleich der Unterschied zwischen den Zahlenwerten geringer als für die Mediane beider Gruppen ausfiel. Für den Vergleich der TT-Viruslasten zwischen Tag 50 bis 100 nach HSCT galt es festzuhalten, dass der Median der Gruppe der Verstorbenen mit  $5,01e6 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml<sup>-1</sup> anderthalbmal oberhalb des Medians der Gruppe der Überlebenden mit  $4,37e6 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml<sup>-1</sup> lag. Zwischen den Mittelwerten beider Gruppen existierte kein signifikanter Unterschied. Dennoch war auch hier eine Tendenz hinzu höheren mittleren Zahlenwerten innerhalb der Gruppe der Verstorbenen zu erkennen. Ebenso wenig waren signifikante Unterschiede für den Vergleich der Zahlenwerte für die AUC 0-300 aufzudecken. Anders als bislang bei den Medianen der AUC 0-50 und 50-100 beobachtet werden konnte, war hier der höher liegende Median der Gruppe der Überlebenden zuzuordnen ( $1,22e7 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml<sup>-1</sup> vs  $9,62e6 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>). Im Mittel wiesen aber die Patienten, die im weiteren Verlauf nach HSCT verstarben, höhere TT-Viruslasten für die AUC 0-300 auf. Die Spitzenwerte beider Gruppen zeigten keine größeren Abweichungen voneinander und waren vergleichbar verteilt. Während die Gruppe der Überlebenden für den Median der Peakwerte einen höheren Zahlenwert erkennen ließ, präsentierte die Gruppe der Verstorbenen den höheren Mittelwert der Peakwerte.

Abschließend konnte damit festgehalten werden, dass die Unterschiede zwischen den Gruppen nur geringfügig ausgebildet waren und zu keinem Zeitpunkt ein signifikantes Ausmaß erreichten. Auch wenn kein vollkommen eindeutiger Trend zu erkennen war, waren die tendenziell höheren Viruslasten in der Gruppe der Patienten zu erkennen, die im weiteren Verlauf nach HSCT verstarben.

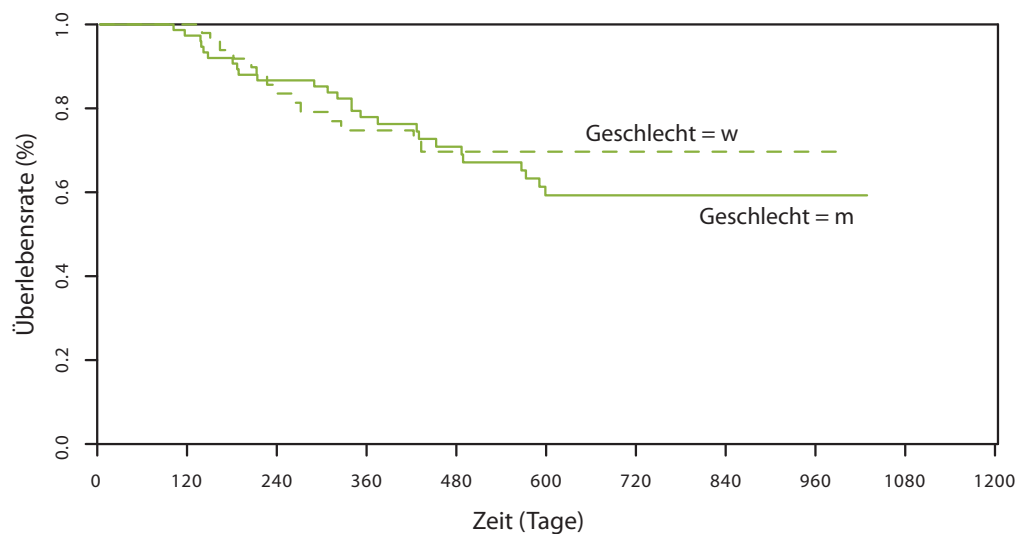
Um die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten nach HSCT im weiteren Verlauf zu dokumentieren, wurde der Kaplan-Meier-Schätzer hinzugezogen (Abb. 18). Dabei zeigte sich, dass ausgehend von einer 100 prozentigen Überlebensrate zum Zeitpunkt der HSCT (Tag 0) eine Abnahme der Überlebensrate auf 63 Prozent bis Tag 600 nach HSCT erfolgte und sich diese konstant auf gleichem Niveau bis Tag 1000 nach HSCT hielt. Der Abfall der Überlebensrate stellte sich dabei recht gleichförmig dar und setzte etwa ab Tag 100 nach HSCT ein.



**Abb. 18:** Darstellung des Kaplan-Meier Schätzers für die Überlebensrate in Prozent der 83 überlebenden und 40 verstorbenen Patienten 1000 Tage nach HSCT. Die mittlere durchgezogene Linie zeigt den Kaplan-Meier-Schätzer, die obere gestrichelte Linie den Median zuzüglich der Standardabweichung, die untere gestrichelte Linie den Median abzüglich der Standardabweichung.

Der Vergleich der Überlebenswahrscheinlichkeit der 74 Männer mit der der 49 Frauen (Abb. 19) ergab, dass in der Anfangsphase bis etwa zum Tag 200 nach HSCT die Überlebenswahrscheinlichkeit der Frauen zunächst oberhalb der Überlebenswahrscheinlichkeit der Männer lag. Zwischen Tag 200 und 480 nach HSCT unterschritt die Überlebenswahrscheinlichkeit der Frauen die der Männer und etwa ab Tag 480 nach HSCT hielt sich die Überlebenswahrscheinlichkeit der Frauen konstant bei etwa 70 Prozent, wohingegen die Überlebenswahrscheinlichkeit der Männer um weitere 10 Prozent auf etwa 60 Prozent absank.

Von den insgesamt 40 verstorbenen Patienten hatten elf Patienten bereits den von der HSCT ausgehenden Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nicht überlebt. Nachfolgend sind die Todesursachen und die im Verlauf aufgetretenen Komplikationen der elf Patienten aufgelistet:



**Abb. 19:** Darstellung des Kaplan-Meier Schätzers für die Überlebensrate in Prozent der 74 männlichen (m) (durchgezogene Linie) und 49 weiblichen (w) Patienten (gestrichelte Linie) 1000 Tage nach HSCT. Die mittlere durchgezogene Linie zeigt den Kaplan-Meier-Schätzer, die obere gestrichelte Linie den Median zuzüglich der Standardabweichung, die untere gestrichelte Linie den Median abzüglich der Standardabweichung.

Patient 1: **Tod** (300 Tage nach SZT) in Folge der GvHD; Sepsis im Zelltief auf dem Boden einer Enteritis mit paralytischem Ileus und anurischem Nierenversagen; Pilzpneumonie; Pangastritis und Kolitis; Anmerkung: Stammzell-Boost ca. 200 Tage nach HSCT

Patient 2: **Tod** (180 Tage nach SZT) in Folge einer Hirnstammb Blutung im Rahmen einer cerebralen Toxoplasmose; **Autologe HSCT** im Vorfeld der hier betrachteten HSCT

Patient 3: **Tod** (200 Tage nach SZT) in Folge einer respiratorischen Insuffizienz im Rahmen einer Pilzpneumonie

Patient 4: **Tod** (300 Tage nach SZT) in Folge eines ZNS-Rezidiv der bekannten ALL; ausgeprägte Mukositis Grad IV

Patient 5: **Tod** (180 Tage nach SZT) in Folge der therapierefraktären AML; Bipulmonale Pilzpneumonie + Infekt mit unklarem Fokus

Patient 6: **Tod** (300 Tage nach SZT) in Folge einer respiratorischen Insuffizienz bei *Pneumocystis jirovecii* Pneumonie

Patient 7: **Tod** (200 Tage nach SZT) in Folge eines fulminanten Progresses der vorbekannten ALL; schwere neurologische Nebenwirkungen im Rahmen der Salvagetherapie mit Blinatumomab

Patient 8: **Tod** (150 Tage nach SZT) in Folge einer bipulmonalen Pneumonie mit respiratorischer Insuffizienz und hohem Katecholaminbedarf + akutes Nierenversagen

Patient 9: **Tod** (330 Tage nach SZT) in Folge einer Infektion mit unklarem Fokus und Sepsis; **Autologe HSCT** im Vorfeld der hier betrachteten HSCT

Patient 10: **Tod** (90 Tage nach SZT) in Folge eines Stammganglieninfarktes mit sekundärer Einblutung; **Allogene HSCT** im Vorfeld der hier betrachteten HSCT

Patient 11: **Tod** (150 Tage nach SZT) in Folge eines hämatologischen Rezidivs der AML mit begleitender disseminierter intravasaler Koagulopathie (DIC) und akutem, prärenalem Nierenversagen

Dabei zeigte sich, dass insbesondere Infektionen (5 Patienten), aber auch die zugrundeliegende Erkrankung an sich (2 Patienten), oder aber ein Rezidiv der zunächst geheilten Erkrankung (2 Patienten) die Haupttodesursachen darstellen. Bei den verbliebenen zwei Patienten konnten abweichende Todesursachen wie ein Stammganglieninfarkt oder die Langzeitfolgen der Graft versus Host Disease gesehen werden. Auffallend ist, dass annähernd ein Drittel der verstorbenen Patienten bereits zum wiederholten Mal stammzelltransplantiert wurden und somit davon auszugehen ist, dass sich diese Patienten in einem besonders reduzierten Allgemeinzustand befanden.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	Remissionsstatus vor Transplantation	CMV Status Empfänger	CMV Status Spender	Matching	verwandter Spender	GvHD- Prophylaxe	Konditionierungsregime	ATG Gabe	aGvHD	cGvHD	Rezidiv
1	M	50	AML	Partielle Remission	Negativ	Positiv	10 v 10	Ja	MMF+CSA	RIC	Nein	Nein	Ja	Nein
2	M	63	MM	Aktive Erkrankung	Positiv	Positiv	10 v 10	Nein	MMF+Tacrolimus	RIC	Ja	Ja	Nein	Nein
3	W	60	AML	Komplettremission	Positiv	Negativ	10 v 10	Nein	MMF+Tacrolimus	RIC	Ja	Ja	Nein	Ja (d 55)
4	M	53	ALL	Komplettremission	Positiv	Negativ	10 v 10	Nein	MMF+Tacrolimus	Myeloablativ	Ja	Ja	Nein	Ja (d 100)
5	M	60	AML	Aktive Erkrankung	Positiv	Positiv	10 v 10	Nein	MMF+CSA	RIC	Ja	Nein	Nein	Ja (d 60)
6	M	50	ALL	Komplettremission	Positiv	Negativ	10 v 10	Ja	MMF+CSA	RIC	Nein	Ja	Nein	Ja (d 100)
7	M	74	ALL	Partielle Remission	Positiv	Positiv	10 v 10	Nein	MMF+Tacrolimus	Myeloablativ	Ja	Ja	Nein	Ja (d 100)
8	W	63	AML	Partielle Remission	Positiv	Positiv	9 v 10	Nein	MMF+Tacrolimus	RIC	Ja	Nein	Nein	Nein
9	M	52	MDS	Partielle Remission	Positiv	Negativ	10 v 10	Ja	MMF+CSA	RIC	Nein	Ja	Nein	Nein
10	M	59	AML	Aktive Erkrankung	Positiv	Negativ	9 v 10	Ja	MMF+CSA	RIC	Nein	Ja	Nein	Ja (d 32)
11	M	61	MDS	Aktive Erkrankung	Negativ	Positiv	10 v 10	Ja	MMF+CSA	RIC	Nein	Nein	Nein	Ja (d 150)

**Tabelle 2: Gegenüberstellung möglicher Gemeinsamkeiten der im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) verstorbenen Patienten.** Dabei wurden die Patienten anonymisiert mit den Zahlen 1 bis 11 aufgelistet und die Einträge innerhalb einer Zeile sind dem der ersten Spalte zu entnehmenden nummerierten Patienten zuzuordnen. Im Folgenden wurde das Geschlecht („M“ für männlich und „W“ für weiblich), das Alter, die Art der Erkrankung („AML“ für akute myeloische Leukämie, „MM“ für multiples Myelom, „ALL“ für akute lymphatische Leukämie, „MDS“ für myelodysplastisches Syndrom), der Remissionsstatus vor Transplantation, der Cytomegalievirus (CMV) IgG Status von Empfänger und Spender, die Matchingpunktzahl von Spender und Empfänger, der Verwandtschaftsgrad von Spender und Empfänger, die Graft versus Host Disease (GvHD)-Prophylaxe („MMF“ für Mycophenolat-Mofetil, „CSA“ für Cyclosporin A), das Konditionierungsregime („RIC“ für reduced intensity conditioning gleichzusetzen mit dosisreduzierter Konditionierung), die Gabe von Anti-Thymozyten-Globulin (ATG), sowie das Auftreten einer akuten GvHD oder einer chronischen GvHD und das Auftreten eines Rezidivs mit Angabe der Tage (d) nach HSCT dargestellt.



Wurden die Patienten auf mögliche übereinstimmende Merkmale hin untersucht (Tabelle 2) ist zu erkennen, dass bezogen auf das Geschlecht mehr Männer (9/11) im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nach HSCT verstarben. Das Alter der verstorbenen Patienten lag im Median bei 60 Jahren. Fünf der verstorbenen Patienten litten unter einer AML – so auch die zwei verstorbenen Frauen. Drei Patienten waren an einer ALL erkrankt, bei zwei Patienten konnte ein MDS diagnostiziert werden und ein Patient wies ein multiples Myelom auf. Damit überwiegen die myeloischen Krankheitsbilder, wenngleich zu bedenken ist, dass mit 97 der 124 Patienten die überwiegende Anzahl der stammzelltransplantierten Patienten an einer myeloischen Neoplasie litten und damit kein ausgewogenes Verhältnis zwischen myeloisch und lymphatisch erkrankten Patienten bestand. Vier der verstorbenen Patienten wiesen zum Zeitpunkt der Transplantation einen aktiven Status ihrer Erkrankung vor. Drei Patienten befanden sich in einer Komplettremission ihrer Erkrankung. Bei den verbliebenen vier Patienten lag eine partielle Remission der Erkrankung zum Zeitpunkt der Transplantation vor. Damit scheint der Remissionsstatus der Erkrankung vor Transplantation nicht ausschlaggebend und prädisponierend für einen folgenden tödlichen Verlauf zu sein. Bei Betrachtung des CMV IgG Status der Empfänger fiel aus, dass bei knapp 82 Prozent ein CMV IgG positiver Status bestand. Fünf der CMV IgG positiven Patienten wurde ein CMV IgG negativer Spender zugeordnet. Bei den vier ebenfalls CMV IgG positiven Empfängern konnte ein Spender mit übereinstimmendem Serostatus gefunden werden. Die zwei CMV IgG negativen Patienten erhielten Stammzellen eines CMV IgG positiven Spenders. Wurden die Patienten hinsichtlich ihres Matchingergebnisses untersucht, konnte bei zwei der elf Patienten eine Mismatch-Situation identifiziert werden. Ungefähr gleich viele Patienten erhielten Stammzellen eines verwandten bzw. nicht verwandten Spenders. Dazu passend wurde fünf der sechs Patienten mit einer Stammzellspende eines Nicht-Verwandten MMF und Tacrolimus als GvHD-Prophylaxe verabreicht, die fünf Patienten mit einer Stammzellspende eines Verwandten substituierten MMF in Kombination mit Cyclosporin A. Bezüglich der Art des verwendeten Konditionierungsregimes konnte festgehalten werden, dass neun der elf Patienten intensitätsreduziert und zwei Patienten myeloablativ konditioniert wurden. Sechs Patienten wurde im Rahmen der Konditionierungstherapie ATG verabreicht. Mehr als die Hälfte (ca. 64 Prozent) der Patienten entwickelte im Verlauf nach Transplantation eine akute Abstoßungsreaktion, ein Patient entwickelte eine chronische GvHD. Sieben der elf Patienten entwickelten innerhalb der ersten 150 Tage nach HSCT ein Rezidiv. Letztlich ist zu sagen, dass es keine eindeutige Merkmalskombination gab, die die verstorbenen Patienten teilten.

Wurden die relativen Häufigkeiten der untersuchten Merkmale bei den Verstorbenen mit den relativen Häufigkeiten im Kollektiv aller Patienten verglichen (Tabelle 3), fiel auf, dass sich im Kollektiv der Verstorbenen signifikant mehr Männer befanden, häufiger Cyclosporin A in Kombination mit Mycophenolat-Mofetil verabreicht wurde, 20 Prozent häufiger ein intensitätsreduziertes Konditionierungsregime angewendet wurde und etwa doppelt so oft akute Abstoßungsreaktionen und Rezidive auftraten.

	Verstorbene	Gesamtkollektiv
Männer	ca. 82%	ca. 60%
Myeloisches Krankheitsbild	ca. 64%	ca. 77%
Partielle-/Komplettremission	ca. 63%	ca. 48%
Deckungsgleicher CMV IgG Serostatus zwischen Spender und Empfänger	ca. 63%	ca. 81%
Nicht verwandter Spender	ca. 55%	ca. 73%
MMF+CSA als GvHD-Prophylaxe	ca. 55%	ca. 25%
Intensitätsreduziertes Konditionierungsregime	ca. 82%	ca. 60%
ATG Gabe	ca. 55%	ca. 70%
Auftreten einer akuten Abstoßungsreaktion	ca. 64%	ca. 27%
Auftreten einer chronischen Abstoßungsreaktion	ca. 1%	ca. 1%
Auftreten eines Rezidivs	ca. 64%	ca. 36%

**Tabelle 3: Vergleich der relativen Häufigkeiten klinischer Merkmale zwischen verstorbenen Patienten und dem Gesamtkollektiv.** Rot hervorgehoben sind signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen. Betrachtet wurden Unterschiede in Bezug auf das Geschlecht, die vorliegende Grunderkrankung, den Cytomegalievirus (CMV)-Serostatus von Spender und Empfänger, den Verwandtschaftsgrad von Spender und Empfänger, die verwendete Graft versus Host Disease (GvHD)-Prophylaxe (Mycophenolat-Mofetil (MMF) und Cyclosporin A), das verwendete Konditionierungsregime, die Gabe von Anti-Thymozyten-Globulin (ATG), das Auftreten einer akuten wie chronischen Abstoßungsreaktion sowie eines Rezidivs.

Schließlich warfen wir die Frage auf, ob eine Rückkehr der TT-Viruslast innerhalb von 345 Tagen nach HSCT zu den Ausgangswerten vor HSCT mit einem schützenden Effekt verbunden sei. Bei insgesamt 32 Patienten konnte eine Wiederkehr der TT-Viruslast am Ende des Beobachtungszeitraumes zu ihren anfänglichen Werten vor HSCT festgestellt werden. Um zu überprüfen, inwieweit eine mögliche Übereinstimmung der TT-Viruslast vor und nach HSCT und damit eine potentiell verbundene vergleichbare Immunlage der Patienten einen protektiven Effekt ausübt, wurde überprüft, wie oft in diesem Kollektiv Rezidive und Todesereignisse auftraten. Von den Patienten mit übereinstimmenden Anfangs- und Endwerten entwickelten 12 Patienten ein Rezidiv (37,5%), und drei Patienten starben (9,3%). Von den Patienten mit unterschiedlichen Anfangs- und Endwerten entwickelten 33 ein Rezidiv (36,3%), und acht Patienten starben (8,8%). Vergleicht man die prozentualen Anteile der beiden Gruppen, so zeigte sich, dass Rückfälle und Todesfälle im Kollektiv derer, die zu ihren Ausgangswerten zurückgekehrt sind, relativ häufiger, aber in keinem signifikanten Ausmaß auftraten ( $p > 0,05$ ).

### 3.17 TT-Viruslast in Abhängigkeit von der GvHD-Prophylaxe (myeloisch Erkrankte)

Im Rahmen des Gruppenvergleiches der myeloisch und lymphatisch erkrankten Patienten hatte sich gezeigt, dass Patienten mit einer lymphatischen Erkrankung signifikant höhere TT-Viruslasten mit einigen Zehnerpotenzen Unterschied im Vergleich zu den TT-Viruslasten der Patienten mit einer myeloischen Erkrankung aufwiesen. Auf Grundlage dieser Beobachtung ent-

schieden wir uns, einige der bereits angestellten Gruppenvergleiche nur mit dem Kollektiv der 97 myeloisch erkrankten Patienten zu wiederholen, um eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch die hohen Viruslasten der lymphatisch erkrankten Patienten zu verhindern.

Dazu wurde erneut untersucht, ob Unterschiede hinsichtlich der Viruslast zwischen den Patienten mit Tacrolimus oder Cyclosporin A Gabe aufzudecken waren. Mit P-Werten zwischen 0,2 und 0,3 für den Vergleich der Peakwerte und der AUC 0-50, 50-100 und 0-300 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Dennoch zeigte sich eine eindeutige Tendenz hin zu höheren TT-Viruslasten innerhalb der Gruppe mit Tacrolimus als GvHD-Prophylaxe. Dieser Trend konnte auch bereits in der Gegenüberstellung beider Gruppen unter Einbeziehung des Gesamtkollektives gesehen werden.

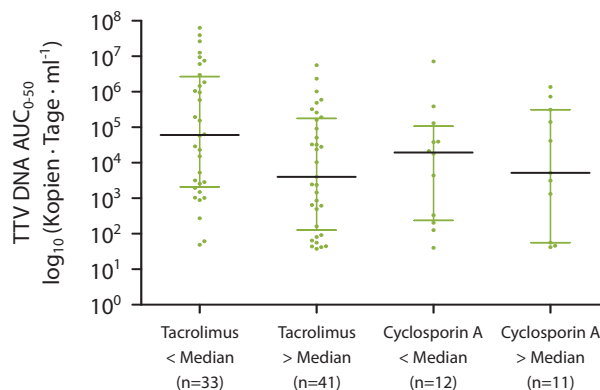
In einem weiteren Schritt wurde die AUC der Tage 0 bis 110 nach HSCT für die im Blut gemessenen Medikamentenspiegel von Tacrolimus und Cyclosporin A berechnet. Ausgehend von dem für jeden Patienten berechneten AUC 0-110 Medikamentenspiegel wurde für die Kollektive der Patienten mit Tacrolimus-Gabe und der Patienten mit Cyclosporin A-Gabe jeweils der dazugehörige Median gebildet, der wiederum eine Aufteilung der beiden Kollektive in jeweils zwei Gruppen zuließ: die Gruppe der Patienten, die mit ihrer AUC 0-110 oberhalb des Medians lagen und damit über die Zeit gemessen nachweisbar höhere Medikamentenspiegel im Blut hatten und die Patienten, die mit ihrer Tacrolimus AUC 0-110 unterhalb des Medians lagen und damit über die Zeit gemessen nachweisbar niedrigere Medikamentenspiegel im Blut hatten. Damit entstanden vier Vergleichsgruppen:

- Tacrolimus-Patienten > Median,
- Tacrolimus-Patienten < Median,
- Cyclosporin A-Patienten > Median,
- Cyclosporin A-Patienten < Median.

Anschließend wurden den Patienten ihre TTV-Gesamtviruslasten in Form der AUC für die Tage 0 bis 50, 50 bis 100 und 0 bis 300 nach HSCT sowie die Peakwerte für die Tage 0 bis 300 nach HSCT zugeordnet.

Der Vergleich der AUC Werte für die Tage 0 bis 50 nach HSCT zeigte (Abb. 20), dass verglichen mit dem Mittelwert der Gruppe Tacrolimus > Median ( $3,43e5 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup>) der Mittelwert der Gruppe Tacrolimus < Median annähernd 16fach höher ( $5,47e6 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup>) lag. Bezogen auf den P-Wert stellte sich der Unterschied zwischen beiden Gruppen mit 0,03 signifikant dar. Für den Vergleich der Mediane der AUC 50-100 konnte festgehalten werden, dass auch hier die Gruppe Tacrolimus < Median die größte mediane Gesamtviruslast aufwies, wengleich die Unterschiede zu den Medianen der anderen Gruppen geringer ausfielen als es

bei der AUC 0-50 der Fall war. Wurden die Mittelwerte für die AUC 50-100 aller vier Gruppen miteinander verglichen, ließ sich erkennen, dass hier die Gruppe Tacrolimus > Median mit  $1,23e7 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup> den größten Mittelwert aufwies, dicht gefolgt von dem Mittelwert der Gruppe Cyclosporin A > Median ( $1,20e7 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup>). Verglichen mit diesen beiden Mittelwerten war der Mittelwert der Gruppe Cyclosporin A < Median achtmal niedriger ( $1,47e6 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup>). Ein signifikanter Unterschied konnte im Gruppenvergleich Cyclosporin A > bzw. < Median aufgedeckt werden (P-Wert von 0,02). Die übrigen Gruppenvergleiche ließen keine Unterschiede im signifikanten Bereich finden. Mit  $9,78e6 \log_{10}$



**Abb. 20: Vergleich der Plasma Torque-Teno-Virus (TTV) DNA Area under curve (AUC) für die Tage 0 bis 50 nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) im Hinblick auf die im Blut gemessene Konzentration der Graft versus Host Disease (GvHD)-Prophylaxe.** Verglichen wurde die TT-Viruslast von vier Gruppen ausgehend von den ermittelten GvHD-Prophylaxe-Konzentrationen: die zwei Gruppen, die mit ihrer Tacrolimus AUC für die Tage 0 bis 110 nach HSCT unterhalb (Tacrolimus < Median) bzw. oberhalb (Tacrolimus > Median) der für das Kollektiv mit Tacrolimus-Gabe berechneten medianen Medikamentenkonzentration lagen und der Gruppen der Patienten, die mit ihrer Cyclosporin A AUC für die Tage 0 bis 110 nach HSCT unterhalb (Cyclosporin A < Median) beziehungsweise oberhalb (Cyclosporin A > Median) der für das Kollektiv mit Cyclosporin A-Gabe berechneten medianen Medikamentenkonzentration lagen. Dabei wurden ausschließlich die 97 Patienten mit einem myeloischen Krankheitsbild berücksichtigt. Jeder Punkt repräsentiert die AUC 0-50 eines einzelnen Patienten. „n“ entspricht der Anzahl der Patienten. „p“ gibt den Signifikanzwert an. Mit einem p-Wert von 0,06 zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den vier Gruppen. Eingezeichnet sind der Median (schwarzer mittlerer Balken) und der Interquartilsabstand (unterer farbiger Balken 25. Interquartilsabstand, oberer farbiger Balken 75. Interquartilsabstand).

Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup> wies die Gruppe Tacrolimus > Median die größten Gesamtviruslasten für den Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nach HSCT auf. Auch bei den Mittelwerten präsentierte sich die Gruppe Tacrolimus > Median mit dem zahlenmäßig größten Mittelwert von  $4,16e7 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup>. Damit lag er mehr als zwölfmal über dem Mittelwert der Gruppe Cyclosporin A < Median ( $3,37e6 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup>) mit dem kleinsten Mittelwert. Der P-Wert von 0,4 des Gesamtgruppenvergleich deutete auf keine signifikanten Differenzen hin, doch der Unterschied zwischen beiden Gruppen (Tacrolimus > Median und Cyclosporin A < Median) ergab einen P-Wert von 0,04 und war damit signifikant. Wurden die Peakwerte der einzelnen Gruppen miteinander verglichen, die im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen gemessen werden konnten, zeigte sich auch hier die Gruppe Tacrolimus > Median sowohl für den Median

( $2,28 \times 10^5$  Kopien/ml) als auch für den Mittelwert ( $8,66 \times 10^5$  Kopien/ml) als die Gruppe mit den höchsten Spitzenwerten. Die größte Differenz – sowohl bei Betrachtung der Mediane, als auch bei den Mittelwerten feststellbar – bestand zu den Spitzenwerten der Gruppe Cyclosporin A < Median, die sich in einem signifikanten P-Wert von  $p < 0,05$  ausdrückte. Der zweit größte Median dieses Gruppenvergleiches war der Gruppe Tacrolimus < Median zuzuordnen ( $2,21 \times 10^5$  Kopien/ml), der damit dreifach größer war als der Median der Gruppe Cyclosporin < Median. Die Mittelwerte beider Gruppen wurden durch etwa das Fünffache voneinander getrennt, was sich in einem P-Wert von 0,03 widerspiegelte.

Insgesamt war festzuhalten, dass sich kein eindeutiges Bild abzeichnete. Grundsätzlich war zu beobachten, dass, bezogen auf die Mediane, Patienten, die Cyclosporin A als GvHD-Prophylaxe erhielten, niedrigere Viruslasten aufwiesen als Patienten, denen Tacrolimus als GvHD-Prophylaxe verabreicht wurde. Wurden die Mittelwerte der vier untersuchten Gruppen betrachtet, konnte diese Beobachtung nicht bestätigt werden. Für die AUC 0-50 war festzuhalten, dass Patienten, die mit ihren Medikamentenspiegeln unterhalb des für die jeweilige Gruppe festgesetzten Medians lagen, höhere Viruslasten besaßen als die Patienten, die den gleichen Wirkstoff erhielten, dieser aber in höherer Konzentration im Blut bestimmt werden konnte. Für die nachfolgenden Gruppenvergleiche zeigte sich ein andersartiges Bild. Hier waren die höheren medianen und mittleren Viruslasten den Gruppen mit oberhalb des Medians liegenden Medikamentenspiegeln zuzuordnen.

### 3.18 TT-Viruslast in Abhängigkeit von der ATG Dosierung (myeloisch Erkrankte)

Im Gruppenvergleich unter Miteinbeziehung aller Patienten konnte gezeigt werden, dass die TT-Viruslasten von Patienten ohne ATG Gabe und mit einer ATG-Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht eine vergleichbare Größe annahmen und sich zusammen von den Patienten mit einer ATG-Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht eindeutig differenzieren ließen. Daher wurden im vorliegenden Fall die Patienten mit keiner oder einer ATG-Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht zu einer Gruppe zusammengefasst.

Insgesamt konnte dabei festgehalten werden, dass auch unter Ausschluss der lymphatisch erkrankten Patienten die größeren Zahlenwerte innerhalb der Gruppe der Patienten mit einer ATG-Dosierung von 20 mg/kg KG gefunden werden konnten. Die Unterschiede erreichten zwar zu keinem Zeitpunkt signifikante Ausprägungen, aber dennoch zeigte sich der Trend, dass eine höhere ATG-Dosierung zu einer höheren TT-Viruslast führte.

Unter Berücksichtigung aller Patienten konnte ein P-Wert von 0,7 für den Vergleich der TTV AUC 0-50 Werte ermittelt werden. Im Kollektiv der nur myeloisch Erkrankten war der P-Wert

mit 0,6 immer noch weit von einem signifikanten Bereich entfernt. Der Median von  $6,38e4 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$  für die Gruppe ATG 20 mg/kg KG befand sich dreieinhalbmal oberhalb des Medians für die Gruppe mit keiner oder einer ATG-Dosierung von 10 mg/kg KG, der bei  $1,80e4 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$  lag. Wurden die AUC 50-100 Zahlenwerte miteinander verglichen, war zu erkennen, dass die Mediane beider Gruppen das Anderthalbfache voneinander trennte mit einem Median von  $4,49e6 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$  für die Gruppe ATG 20 mg/kg KG und einem Median von  $2,81e6 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$  für die Gruppe ohne oder ATG 10 mg/kg KG. Der Mittelwert der Gruppe ATG 20 mg/kg KG war doppelt so hoch wie der Mittelwert der Gruppe ohne oder ATG Gabe 10 mg/kg KG. Im Rahmen des Gruppenvergleiches für das Gesamtkollektiv konnte ein P-Wert von 0,1 ermittelt werden. Der Unterschied zwischen beiden Kollektiven unter den myeloisch erkrankten Patienten war geringer ausgebildet (P-Wert von 0,2), eine Tendenz hinzu höheren Viruslasten für die Gruppe der Patienten mit einer ATG-Dosierung von 20 mg/kg KG bestand allerdings weiterhin. Für die AUC 0-300 konnte festgehalten werden, dass hier eine große Diskrepanz zwischen dem vorliegenden untersuchten Kollektiv und der Gesamtpopulation aller Patienten auffiel. Waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen unter Miteinbeziehung der lymphatisch erkrankten Patienten signifikant ausgebildet, konnten nun – unter Auslassung der lymphatisch erkrankten Patienten – keine Signifikanzen identifiziert werden.

Wurden die Werte der einzelnen Gruppen im Gesamtkollektiv mit den Werten der hier nur untersuchten myeloischen Gruppen verglichen, stellte sich heraus, dass für die Gruppe der Patienten, die keine oder eine ATG-Dosierung von 10 mg/kg KG erhielten, eine Abnahme von 106 Patienten auf 85 Patienten zu verzeichnen war, was einer prozentualen Reduktion von etwa 20 Prozent entsprach. Der Gruppe mit einer ATG-Dosierung von 20 mg/kg KG konnten im Gesamtkollektiv aller Patienten 18 Patienten zugeordnet werden, unter Ausschluss der lymphatisch erkrankten Patienten blieb eine Anzahl von 12 Patienten bestehen – und damit etwa 33 Prozent weniger. Damit konnte gezeigt werden, dass unter alleiniger Berücksichtigung der absoluten Zahlen in der Gruppe mit keiner oder einer ATG-Dosierung von 10 mg/kg KG ein größerer Verlust an Patienten zu verzeichnen war. Wurden allerdings die prozentualen Rückgänge an Patienten betrachtet, wirkte sich das Wegfallen der sechs von insgesamt 18 Patienten innerhalb der Gruppe mit einer ATG-Dosierung von 20 mg/kg KG stärker aus und eine größere Beeinflussung der AUC Zahlenwerte für diese Gruppe war damit in Betracht zu ziehen. Daher musste davon ausgegangen werden, dass aufgrund der prozentual betrachteten größeren Einbußen an lymphatisch erkrankten Patienten für die Gruppe ATG 20 mg/kg KG – und damit einem spürbareren Wegfall höherer Viruslasten – in der Folge Median und Mittelwert der Zahlenwerte für diese Gruppe abgesenkt wurden. Damit wurden die Unterschiede zu den Zahlenwerten der Vergleichsgruppe geschmälert. So lag der Median für die AUC 0-300 der Gruppe ATG 20 mg/kg KG im Gesamtkollektiv bei  $7,71e7 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$ , und der Mittelwert für die AUC 0-300 konnte bei  $1,63e8 \log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml $^{-1}$  eingeordnet werden. Wurden allein die myeloisch erkrankten Patienten



untersucht, befand sich hier der Median für die AUC 0-300 bei  $4,00e7 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup> und der Mittelwert für die AUC 0-300 bei  $4,79e7 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup>.

In einem letzten Schritt wurden die Peakwerte beider Gruppen einander gegenübergestellt. Verglichen mit den Ergebnissen, die im Gruppenvergleich unter Miteinbeziehung aller Patienten erzielt werden konnten, waren auch hier die Unterschiede geringer ausgeprägt. Dabei stand einem P-Wert von 0,09 für das Gesamtkollektiv ein P-Wert von 0,3 für die myeloisch erkrankten Patienten gegenüber.

### **3.19 TT-Viruslast in Abhängigkeit von dem Auftreten einer aGvHD (myeloisch Erkrankte)**

Ebenfalls galt es zu überprüfen, inwieweit es unter nicht Berücksichtigung der lymphatisch erkrankten Patienten zu Verschiebungen der Zahlenwerte der Gruppen ohne aGvHD  $\geq$  Grad II und mit aGvHD  $\geq$  Grad II gekommen war. Die Analyse der Ergebnisse des Gruppenvergleiches unter Miteinbeziehung aller Patienten erbat, dass dort keine signifikanten Unterschiede feststellbar waren. Dennoch konnte mit Ausnahme der Zahlenwerte der AUC 0-50 gezeigt werden, dass die tendenziell höheren Viruslasten der Gruppe mit aGvHD  $\geq$  Grad II zuzuordnen waren.

Im vorliegenden Fall wurden die AUC 0-50 Zahlenwerte beider Gruppen nur für die myeloisch erkrankten Patienten miteinander verglichen. Dabei zeigte sich auf den ersten Blick eine recht gleichmäßige Verteilung der TT-Gesamtviruslasten beider Gruppen für die ersten 50 Tage nach HSCT. Der Median der Gruppe ohne aGvHD  $\geq$  Grad II war graduell höher einzuordnen als der Median der Gruppe mit aGvHD  $\geq$  Grad II. Die Mittelwerte beider Gruppen trennte annähernd das Doppelte und auch hier wies die Gruppe der Patienten ohne aGvHD  $\geq$  Grad II die höheren Viruslasten auf. Diese Ergebnisse waren übereinstimmend mit den Erkenntnissen, die im Gruppenvergleich aller Patienten gewonnen werden konnten. Auch dort war die Viruslast innerhalb der ersten 50 Tage nach HSCT derer höher, die im weiteren Verlauf keine akute Abstoßungsreaktion entwickelten. Für die sich anschließenden weiteren 50 Tage nach HSCT – also die Tage 50 bis 100 nach HSCT – war festzuhalten, dass der Median der Gruppe mit aGvHD  $\geq$  Grad II oberhalb des Medians der Vergleichsgruppe lag. Der Unterschied beider Mediane für die AUC 50-100 kann auf etwa das Doppelte beziffert werden mit einem Median von  $5,75e6 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup> für die Gruppe mit aGvHD  $\geq$  Grad II und einem Median von  $2,89e6 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup> für die Gruppe ohne aGvHD  $\geq$  Grad II. In dem Vergleich der Mediane beider Gruppen im Gesamtkollektiv stellte sich der Unterschied vergleichbar groß dar. Wurden die Zahlenwerte der AUC 0-300 der ausschließlich myeloisch erkrankten Patienten miteinander verglichen, stellt sich heraus, dass die Mediane beider Gruppen in etwa das Anderthalbfache voneinander trennte. Dabei konnte dem Median der Gruppe mit aGvHD  $\geq$  Grad II der höhere Zahlenwert mit  $9,94e6 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup> zugeordnet werden. Der Median der Vergleichsgruppe lag bei  $6,71e6$

$\log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup>. Der P-Wert von 0,9, der sich aus diesem Gruppenvergleich ergab, ließ bereits auf geringe Unterschiede der Mittelwerte beider Gruppen schließen (Mittelwert für die Gruppe mit aGvHD  $\geq$  Grad II  $3,34e7 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup> vs Mittelwert der Gruppe ohne aGvHD  $\geq$  Grad II  $3,62e7 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup>). Bei den Peakwerten befand sich der Median der Gruppe mit aGvHD  $\geq$  Grad II anderthalbmal über dem Median der Gruppe ohne aGvHD  $\geq$  Grad II, was in gleicher Weise auch in dem Gruppenvergleich aller Patienten gesehen werden konnte.

Abschließend konnte damit festgehalten werden, dass bezogen auf die Mediane weiterhin ein Trend hin zu höheren Viruslasten innerhalb der Gruppe mit aGvHD  $\geq$  Grad II bestand. Bezogen auf die Mittelwerte war im weiteren Verlauf kein größerer Unterschied zwischen den Zahlenwerten beider Gruppen erkennbar, doch wiesen die Patienten mit Ausbleiben einer akuten Abstoßungsreaktion von mindestens Grad II tendenziell höhere Viruslasten auf. Damit ließ sich kein eindeutiger Trend beschreiben, der im Verlauf der 300 Tage nach HSCT zu erkennen gewesen wäre. Die Ergebnisse, die im vorliegenden Gruppenvergleich erhoben werden konnten, waren übereinstimmend mit den Ergebnissen, die auch unter Miteinbeziehung der lymphatisch erkrankten Patienten beobachtet werden konnten.

### **3.20 TT-Viruslast in Abhängigkeit von der Behandlung einer aGvHD (myeloisch Erkrankte)**

Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss die medikamentöse Behandlung der aGvHD  $\geq$  Grad II auf die TT-Viruslast ausübte. Dabei bekamen 18 der insgesamt 26 Patienten hoch dosiert Steroide, 4 Patienten wurde ein Tyrosinkinaseinhibitor in Form von Ruxolitinib verabreicht und weitere 4 Patienten erhielten monoklonale Antikörper im Rahmen der Eskalationstherapie.

Für die Zahlenwerte der AUC 0-50 konnte festgehalten werden, dass die Gruppe mit Tyrosinkinaseinhibitorthherapie einen um mehr als eine Zehnerpotenz höher liegenden Median als die Vergleichsgruppen aufwies ( $3,21e5 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup> für die Gruppe mit Tyrosinkinaseinhibitorthherapie vs  $1,30e4 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup> für die Gruppe mit Steroidtherapie vs  $9,15e3 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup> für die Gruppe mit monoklonaler Antikörpertherapie). Bezogen auf die Mittelwerte zeigte sich ein anderes Bild. Hier konnte der Gruppe mit Steroidtherapie der am höchsten bezifferte Mittelwert dieses Gruppenvergleiches zugeordnet werden. Für die TT-Gesamtviruslast der AUC 50-100 ergab sich bezogen auf die Mediane ein vergleichbares Bild wie bei der AUC 0-50. Mit  $1,30e7 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup> wies die Gruppe mit Tyrosinkinaseinhibitorthherapie den höchsten Median auf, knapp zweifach niedriger war der Median der Gruppe mit Steroidtherapie ( $7,20e6 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup>) und annähernd 15fach kleiner war der Median der Patienten mit monoklonaler Antikörpertherapie ( $8,68e5 \log_{10}$  Kopien · Tage · ml<sup>-1</sup>). Die Mittelwerte der AUC 50-100 der drei Gruppen waren in einer vergleichbaren Größenordnung



zueinander einzuordnen wie es bereits für die Mediane dieses Gruppenvergleiches beschrieben wurde. Insgesamt zeigte sich eine große Ähnlichkeit in der Anordnung der Zahlenwerte für die AUC 50-100 und der AUC 0-300. So trennte den am höchsten ermittelten Median dieses Gruppenvergleiches, der der Gruppe mit Tyrosinkinaseinhibitortherapie zuzuordnen war, mit  $2,75e7 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$  etwa das Doppelte von dem Median der Gruppe mit Steroidtherapie ( $1,35e7 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) und etwa der 23-fache von dem Median der Gruppe mit monoklonaler Antikörpertherapie ( $1,20e6 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Die Mittelwerte der AUC 0-300 der drei Gruppen befanden sich in größerer Nähe zueinander, dennoch waren die Unterschiede nicht signifikant ausgebildet (P-Wert von 0,8). Dabei waren alle drei Mittelwerte bei 107 auszumachen, mit einem maximalen Mittelwert von  $4,86e7 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$  für die Gruppe mit Tyrosinkinaseinhibitortherapie. Darauf folgten die Mittelwerte der Gruppen mit Steroidtherapie und monoklonaler Antikörpertherapie. Auch bei den Peakwerten lagen sowohl in Bezug auf die Mediane, als auch für die Mittelwerte geltend die verhältnismäßig größten Spitzenwerte innerhalb der Gruppe der Patienten mit einer Tyrosinkinaseinhibitortherapie, die niedrigsten Spitzenwerte dagegen innerhalb der Gruppe mit monoklonaler Antikörpertherapie.

Mit Ausnahme der Mittelwerte der AUC 0-50 konnte abschließend festgehalten werden, dass die Gruppe mit Tyrosinkinaseinhibitortherapie durchgängig mit ihren Zahlenwerten oberhalb der Mediane und Mittelwerte der Vergleichsgruppen einzuordnen war. Dabei stellte sich der Unterschied zu der Gruppe mit monoklonaler Antikörpertherapie am ausgeprägtesten dar.

### 3.21 TT-Viruslast in Abhängigkeit von dem Auftreten eines Rezidivs (myeloisch Erkrankte)

Im Rahmen des sich folgenden Gruppenvergleiches wurde überprüft, ob unter Ausschluss der 26 lymphatisch erkrankten Patienten im Kollektiv der myeloisch erkrankten Patienten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen der Patienten mit und ohne Rezidiv auftraten. Dazu wurden 37 Patienten mit Rezidiven im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nach HSCT 60 Patienten ohne Rezidiv innerhalb derselben Zeitspanne gegenübergestellt. Unter Einschluss der lymphatisch erkrankten Patienten hatte sich für das Gesamtkollektiv gezeigt, dass Patienten ohne Rezidiv im zeitlichen Verlauf konstant höhere TT-Viruslasten aufwiesen als die Vergleichsgruppe bestehend aus Patienten mit aufgetretenem Rezidiv. Zwar konnte ein eindeutiger Trend erkannt werden, doch die bestehenden Unterschiede waren nicht signifikant ausgeprägt.

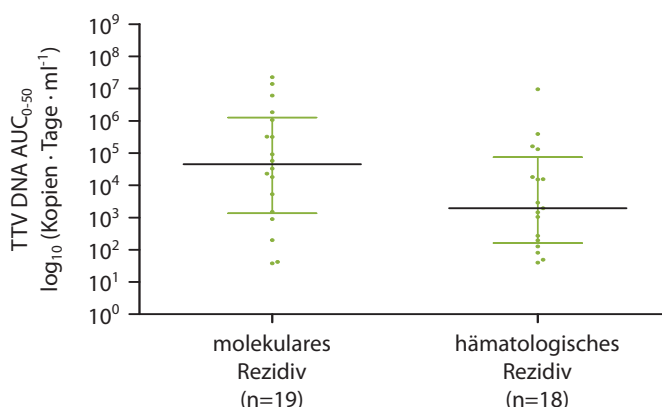
Der Vergleich der AUC 0-50 Zahlenwerte der TT-Gesamtviruslast beider Gruppen unter den myeloisch erkrankten Patienten zeigte auch hier auf den ersten Blick mit einem P-Wert von 0,5 ebenfalls keinen signifikanten Unterschied. Konnte zwischen den Mittelwerten beider Gruppen im Gesamtkollektiv für die AUC 0-50 ein Unterschied von dem 1,2fachen gesehen werden, trennte hier das 1,6fache beide Mittelwerte. Auch hier war der höhere mittlere Zahlenwert mit  $2,82e6$

$\log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml<sup>-1</sup> der Gruppe ohne Rezidiv zuzuordnen. In der Vergleichsgruppe lag der Mittelwert bei 1,74e6  $\log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>. Das Größenverhältnis der Mediane zueinander betrug wie bei den Mittelwerten auch das 1,6fache mit einem höheren Median für die Gruppe mit Rezidiv. Für den Vergleich der AUC 50-100 Zahlenwerte konnte festgehalten werden, dass der Unterschied zwischen den Medianen beider Gruppen mit mehr als dem Doppelten größer war als der Unterschied zwischen den Mittelwerten, der sich auf knapp das 1,1fache belief. Auch hier besaß die Gruppe der Patienten ohne Rezidiv die höheren TT- Viruslasten. Verglichen mit dem P-Wert von 0,9 für den Vergleich der AUC 0-300 Werte im Gesamtkollektiv, konnte bei den myeloisch Erkrankten ein P-Wert von 0,5 ermittelt werden. Der Median der Gruppe ohne Rezidiv war mit 9,23e6  $\log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml<sup>-1</sup> zweifach höher als der Median der Gruppe mit Rezidiv von 4,56e6  $\log_{10}$  Kopien  $\cdot$  Tage  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>. Wie bereits im Rahmen des Gruppenvergleiches der AUC 50-100 gesehen werden konnte, lag zwischen den Mittelwerten beider Gruppen ein geringerer Abstand. In einem letzten Schritt wurden die Peakwerte beider Gruppen miteinander verglichen. Dabei zeigte sich bezogen auf die Mediane und Mittelwerte ein graduell höherer Zahlenwert für die Gruppe mit Rezidiv, was im Widerspruch zu den bisherigen Beobachtungen stand – sowohl auf das Kollektiv der myeloisch Erkrankten als auch auf das Gesamtkollektiv bezogen.

Zusammenfassend war festzuhalten, dass sowohl im Gesamtkollektiv als auch im Kollektiv der myeloisch erkrankten Patienten bezogen auf die AUC Zahlenwerte ein Trend hin zu höheren TT-Viruslasten innerhalb der Gruppe ohne Rezidiv zu erkennen war. Die Größenverhältnisse zwischen den Medianen und Mittelwerten im Gesamtkollektiv waren durchaus vergleichbar mit den Größenverhältnissen der Mediane und Mittelwerte im Kollektiv der myeloisch Erkrankten. Dies wiederum ließ vermuten, dass sich der Ausschluss der lymphatisch Erkrankten in gleicher Weise auf beide Gruppen auswirkte und sich der Wegfall der höheren Viruslasten in keinen größeren Verschiebungen innerhalb nur einer Gruppe niederschlug. Neben den in beiden Kollektiven insgesamt sehr ähnlichen Ergebnissen, fiel allerdings auch das Ergebnis des Vergleichs der Spitzenwerte beider Gruppen auf. Konnten im Gesamtkollektiv auch höhere Peakwerte innerhalb der Gruppe der Patienten ohne Rezidiv gesehen werden, war dieser Trend unter den allein myeloisch erkrankten Patienten nicht mehr zu erkennen. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass der Wegfall der höheren Viruslasten der lymphatisch erkrankten Patienten insbesondere bei den Spitzenwerten spürbar wurde und dabei vor allem das Kollektiv der Patienten ohne Rezidiv betroffen zu sein schien.

Wurden die 37 myeloisch erkrankten Patienten mit Ausbildung eines Rezidivs innerhalb der ersten 300 Tage nach HSCT hinsichtlich der Art des erlittenen Rezidivs untersucht, konnten zwei Gruppen voneinander unterschieden werden: die Patienten, die ein molekulares Rezidiv und die Patienten, die ein hämatologisches Rezidiv entwickelten. Die beiden Gruppen waren vergleichbar groß (n= 19 für die Gruppe der Patienten mit molekularem Rezidiv und n=18 für die Gruppe der Patienten mit hämatologischem Rezidiv).

Wurden die AUC 0-50 Zahlenwerte einander gegenübergestellt (Abb. 21), war zu erkennen, dass mit einer Zehnerpotenz Unterschied der Median der Gruppe mit molekularem Rezidiv mit  $4,53e4 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$  23fach höher als der Median der Gruppe mit hämatologischem Rezidiv von  $1,59e3 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$  lag. Der Mittelwert der Gruppe mit molekularem Rezidiv ( $2,57e6 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) entsprach dem Vierfachen des Mittelwertes der Gruppe mit hämatologischem Rezidiv ( $6,02e5 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Für die AUC 50-100 war festzuhal-



**Abb. 21: Vergleich der Plasma Torque-Teno-Virus (TTV) DNA Area under curve (AUC) für die Tage 0 bis 50 nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) im Hinblick auf die Art des aufgetretenen Rezidivs.** Verglichen wurden die Gruppen mit molekularem und hämatologischem Rezidiv im Beobachtungszeitraum von 300 Tagen nach HSCT. Dabei wurden ausschließlich die 37 Patienten mit einem Rezidiv unter den myeloisch erkrankten Patienten berücksichtigt. Jeder Punkt repräsentiert die AUC 0-50 eines einzelnen Patienten. „n“ entspricht der Anzahl der Patienten. „p“ gibt den Signifikanzwert an. Mit einem p-Wert von 0.2 zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Eingezeichnet sind der Median (schwarzer mittlerer Balken) und der Interquartilsabstand (unterer farbiger Balken 25. Interquartilsabstand, oberer farbiger Balken 75. Interquartilsabstand).

ten, dass der Median der Gruppe mit molekularem Rezidiv ( $5,28e6 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) elfeinhalbfach oberhalb des Medians der Vergleichsgruppe ( $4,53e5 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) eingeordnet werden konnte. Auch bei der AUC 0-300 waren – wie bereits für die AUC 0-50 und die AUC 50-100 gesehen werden konnte – die einzelnen Zahlenwerte der Gruppe mit molekularem Rezidiv auf einem höheren Zahlenniveau als die Zahlenwerte der Gruppe mit hämatologischem Rezidiv. Für den Median hieß das: der Median der Gruppe mit hämatologischem Rezidiv ( $1,80e6 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) war fünffach kleiner im Vergleich zu dem Median der Gruppe mit molekularem Rezidiv ( $9,02e6 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Eine Differenz von etwa dem Dreifachen trennte die Mittelwerte beider Gruppen mit einer mittleren Viruslast von  $4,47e7 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$  für die Gruppe mit molekularem Rezidiv und einer mittleren Viruslast von  $1,58e7 \log_{10} \text{ Kopien} \cdot \text{Tage} \cdot \text{ml}^{-1}$  für die Gruppe mit hämatologischem Rezidiv. Der P-Wert von 0,07 für den Gruppenvergleich der Peakwerte ließ größere Unterschiede der Zahlenwerte beider Gruppen vermuten. In der Tat unterschied die Mittelwerte beider Gruppen in etwa das Dreifache und die Mediane in etwa das Siebenfache.

Abschließend konnte festgehalten werden, dass Patienten, die im weiteren Verlauf von 300 Tagen nach HSCT ein molekulares Rezidiv entwickelten, bereits innerhalb der ersten 50 Tage nach HSCT höhere TT-Gesamtviruslasten aufwiesen als die Vergleichsgruppe der Patienten mit Entwicklung eines hämatologischen Rezidivs. Im weiteren Verlauf – abgebildet durch die AUC 50-100 und die AUC 0-300 – lag die TT-Viruslast derer mit molekularem Rezidiv weiterhin konsequent oberhalb der TT-Viruslast der Patienten mit hämatologischem Rezidiv. Zu keinem Zeitpunkt erreichten die Unterschiede zwischen den Zahlenwerten beider Gruppen ein signifikantes Niveau. Insgesamt war aber ein eindeutiger Trend erkennbar.

### 3.22 Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman

In einem letzten Schritt wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet, um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen der Entwicklung der TT-Viruslast über die Zeit und der Entwicklung der erhobenen Immunstatuswerte über die Zeit vorlag. Es mussten pro Patient von zwei unterschiedlichen Zeitpunkten nach HSCT Werte der Immunzellen sowie Werte über die dazu gehörige TT-Viruslast zur Verfügung stehen, damit die Berechnung eines individuellen Korrelationskoeffizienten durchgeführt werden konnte. Die Werte der Immunzellen wurden eigenständig durch die Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf bestimmt. Lagen keine zwei unabhängigen Messwerte vor, konnte für diesen Patienten kein Korrelationskoeffizient ermittelt werden. Aus den für jeden Patienten berechneten einzelnen Korrelationskoeffizienten wurde ein gemeinsamer Mittelwert für das Gesamtkollektiv gebildet. Der Korrelationskoeffizient konnte Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Lag der Korrelationskoeffizient oberhalb von 0, lag ein positiver Zusammenhang vor. Lag der Korrelationskoeffizient unterhalb von 0, lag ein negativer Zusammenhang vor. Grundsätzlich galt, je näher der Korrelationskoeffizient bei 0 angesiedelt war, desto schwächer war der Zusammenhang und je näher der Korrelationskoeffizient bei -1 oder +1 angesiedelt war, desto stärker war der Zusammenhang. Insgesamt wurde in 13 Gruppen untersucht, ob die TT-Viruslast mit menschlichen Immunzellen korrelierte.

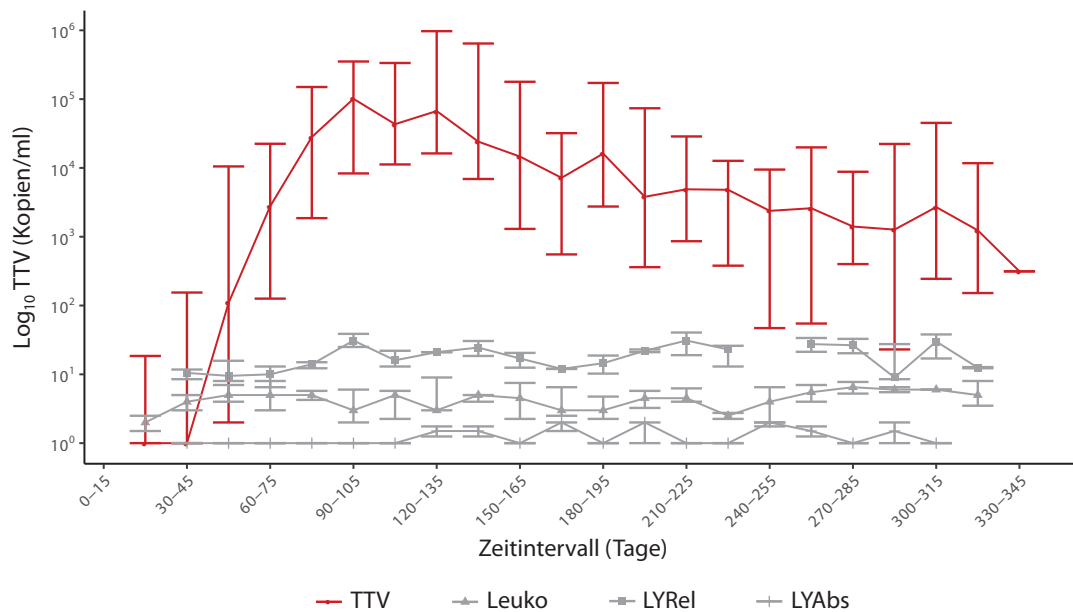
Mit einem durchschnittlichen Korrelationskoeffizienten von -0.008 für das Gesamtkollektiv zeigte sich ein sehr schwacher negativer Zusammenhang zwischen der TT-Viruslast und dem prozentualen Verhältnis der CD3 positiven T-Zellen aus der Gesamtzahl der CD45 positiven Lymphozyten. Mit einem durchschnittlichen Korrelationskoeffizienten von 0.007 für das Gesamtkollektiv zeigte sich ein sehr schwacher positiver Zusammenhang zwischen der TT-Viruslast und der absoluten Gesamtzahl der CD3 positiven T-Zellen. Mit einem durchschnittlichen Korrelationskoeffizienten von -0.013 für das Gesamtkollektiv zeigte sich ein sehr schwacher negativer Zusammenhang zwischen der TT-Viruslast und dem prozentualen Verhältnis der CD3 und CD8 positiven T-Suppressor-Zellen aus der Gesamtzahl der CD45 positiven Lymphozyten. Mit einem durchschnittlichen Korrelationskoeffizienten von 0.003 für das Gesamtkollektiv zeigte sich ein sehr

schwacher positiver Zusammenhang zwischen der TT-Viruslast und der absoluten Gesamtzahl der CD3 und CD8 positiven T-Suppressor-Zellen. Mit einem durchschnittlichen Korrelationskoeffizienten von 0.045 für das Gesamtkollektiv zeigte sich ein sehr schwacher positiver Zusammenhang zwischen der TT-Viruslast und dem prozentualen Verhältnis der CD3 und CD4 positiven T-Helfer-Zellen aus der Gesamtzahl der CD45 positiven Lymphozyten. Mit einem durchschnittlichen Korrelationskoeffizienten von 0.069 für das Gesamtkollektiv zeigte sich ein sehr schwacher positiver Zusammenhang zwischen der TT-Viruslast und der absoluten Gesamtzahl der CD3 und CD4 positiven T-Helfer-Zellen. Mit einem durchschnittlichen Korrelationskoeffizienten von 0.092 für das Gesamtkollektiv zeigte sich ein sehr schwacher positiver Zusammenhang zwischen der TT-Viruslast und der absoluten Gesamtzahl der CD3, CD4 und CD8 positiven T-Helfer-Zellen. Mit einem durchschnittlichen Korrelationskoeffizienten von 0.089 für das Gesamtkollektiv zeigte sich ein sehr schwacher positiver Zusammenhang zwischen der TT-Viruslast und dem prozentualen Verhältnis der CD16 und CD56 positiven NK-Zellen aus der Gesamtzahl der CD45 positiven Lymphozyten. Mit einem durchschnittlichen Korrelationskoeffizienten von 0.084 für das Gesamtkollektiv zeigte sich ein sehr schwacher positiver Zusammenhang zwischen der TT-Viruslast und der absoluten Gesamtzahl der CD16 und CD56 positiven NK-Zellen. Mit einem durchschnittlichen Korrelationskoeffizienten von 0.021 für das Gesamtkollektiv zeigte sich ein sehr schwacher positiver Zusammenhang zwischen der TT-Viruslast und dem prozentualen Verhältnis der CD19 und CD45 positiven B-Zellen aus der Gesamtzahl der CD45 positiven Lymphozyten. Mit einem durchschnittlichen Korrelationskoeffizienten von 0.026 für das Gesamtkollektiv zeigte sich ein sehr schwacher positiver Zusammenhang zwischen der TT-Viruslast und der absoluten Gesamtzahl der CD19 positiven B-Zellen. Mit einem durchschnittlichen Korrelationskoeffizienten von 0.03 für das Gesamtkollektiv zeigte sich ein sehr schwacher positiver Zusammenhang zwischen der TT-Viruslast und der absoluten Gesamtzahl der CD45 positiven Lymphozyten.

Insgesamt wurden zu 528 Zeitpunkten in dem betrachteten Zeitraum vor und nach HSCT Werte erhoben – 458 Mal wurden dabei die Werte der Immunzellen nach HSCT ermittelt. Es erfolgte frühestens zwei und spätestens 311 Tage nach HSCT die erste Messung. Im Median wurden dabei an Tag 142 und im Mittel wurden an Tag 140 nach HSCT die Werte der Immunzellen bestimmt. Damit war vornehmlich eine Aussage zum Langzeitverlauf nach HSCT möglich und nicht primär zu den ersten Tagen. Das stellte auch eine mögliche Erklärung für den nur gering vorhandenen Korrelationskoeffizienten der TT-Viruslast und der absoluten Lymphozytenzahl dar. Denn wird angenommen, dass das TT-Virus in den Lymphozyten repliziert, müsste nach der Aplasiaphase mit dem Anstieg der Lymphozyten auch das TT-Virus ansteigen.

Wurden die Lymphozytenwerte aus dem Zentrallabor stammend über die Zeit aufgetragen (Abb. 22), die engmaschig nach HSCT bestimmt wurden, zeigte sich ein Anstieg der Lymphozyten und Leukozyten einige Tage vor einem dann folgenden Anstieg der TT-Viruslast. Diese Beobachtung ließ sich auch mit entsprechenden Zahlenwerten belegen. So lag der Tag der Leukozytenrekonstruktion, definiert als erster von drei aufeinanderfolgenden Tagen mit Leukozytenwerten  $> 1000$

für das Gesamtkollektiv bei Tag 11 nach HSCT (Spanne zwischen Tag 6 und Tag 58 nach HSCT), wohingegen bei Patienten mit positivem TTV Nachweis vor HSCT ein Anstieg der TT-Viruslast über 19 Kopien/ml Plasma im Median an Tag 32 nach HSCT (Spanne zwischen Tag 2 und Tag 83) das erste Mal erfolgte und bei Patienten ohne vorausgegangenen TTV-Nachweis vor HSCT im Median an Tag 41 nach HSCT (Spanne zwischen Tag 3 und Tag 66) die festgesetzte Grenze von 19 Kopien/ml Plasma überschritten wurde. Erreichten die Leuko- und Lymphozytenwerte im weiteren Verlauf nach HSCT ein konstantes Niveau mit nur geringen Abweichungen, zeigte sich die Entwicklung der TT-Viruslast davon losgelöst und somit keine Korrelation.



**Abb. 22:** Übersichtsgraph der Entwicklung der Torque-Teno-Virus (TTV)-Last (in rot dargestellt) und der Entwicklung der Leukozyten- (Leuko), relativen Lymphozyten- (LYRel) und absoluten Lymphozytenzahl (LYAbs) (alle drei in grau dargestellt) der 123 Patienten zwischen Tag 0 bis 345 nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT). Die Punkte repräsentieren die Mediane, die aus den vorhandenen Viruslasten aller Patienten in den jeweils betrachteten Zeiträumen von 15 Tagen gebildet wurden. Eingezeichnet sind überdies der 25. Interquartilsabstand (unterer Balken) und der 75. Interquartilsabstand (oberer Balken).

### 3.23 Untersuchung der Korrelationen zwischen den Einflussfaktoren

Aufgrund der Heterogenität des betrachteten Kollektivs, sollte in einem weiteren Schritt überprüft werden, ob und inwieweit die einzelnen Faktoren, die einen signifikanten Einfluss auf die TT-Viruslast ausübten (Geschlecht, Alter, Erkrankung, TTV- und Remissionsstatus vor HSCT, Konditionierungsregime, CMV-Serostatus und ATG-Dosis), miteinander korrelierten und sich gegenseitig beeinflussten. Es zeigte sich eine wechselseitige Einflussnahme der Faktoren aufeinander, die mit bestimmten Konstellationen unterschiedlicher TT-Viruslasten assoziiert waren (Tabelle 4). So korrelierten die Faktoren Erkrankung und Geschlecht, TTV-Nachweis vor HSCT und



Erkrankung, Remissionsstatus zum Zeitpunkt der HSCT und Erkrankung, Konditionierungsregime und Alter, Konditionierungsregime und Erkrankung, Konditionierungsregime und Remissionsstatus, ATG-Dosierung und Remissionsstatus sowie frühere Stammzelltransplantation und ATG-Dosierung signifikant ( $p < 0,05$ ) miteinander. Dabei ist zusammenfassend festzuhalten, dass Männer häufiger an lymphatischen Erkrankungen litten: 22 von 26 (84,6%) Patienten mit lymphatischen Erkrankungen und 52 von 97 (53,6%) Patienten mit myeloischen Erkrankungen waren Männer ( $p=0,017$ ). Patienten  $> 54$  Jahre hatten eine weniger schwere Konditionierungstherapie: 52 von 65 (80,0%) der Patienten  $> 54$  Jahre und 23 von 58 (39,7%) der Patienten  $< 54$  Jahre erhielten ein intensitätsreduziertes Konditionierungsschema ( $p= 0,000$ ). Patienten mit lymphatischen Erkrankungen erhielten häufiger eine myeloablative Konditionierungstherapie: 16 von 26 (61,5%) Patienten mit einer lymphatischen Erkrankung und 32 von 97 (32,9%) Patienten mit einer myeloischen Erkrankung erhielten ein myeloablatives Konditionierungsschema ( $p = 0,017$ ). Patienten mit einer lymphatischen Erkrankung waren vor der HSCT häufiger TTV-DNA-positiv: 17 von 26 (65%) Patienten mit lymphatischer Erkrankung und 37 von 97 (38%) Patienten mit myeloischer Erkrankung hatten vor der HSCT nachweisbare TTV-DNA ( $p= 0,008$ ). Patienten mit einem aktiven Krankheitszustand vor der HSCT erhielten häufiger hohe Dosen von ATG: 16 von 64 (25,0%) der Patienten mit einer aktiven Krankheit und 2 von 59 Patienten (3,4%) mit einer Remission vor HSCT erhielten ATG in der höheren Dosis von 20 mg/kg BW ( $p=0,006$ ). Schließlich erhielten Patienten mit früherer HSCT weniger häufig ATG: 8 von 17 (47,1%) der Patienten mit früherer HSCT erhielten ATG in der niedrigeren Dosis von 10 mg/kg BW, die anderen neun Patienten (52,9%) kein ATG. Im Gegensatz dazu erhielten 61 von 106 (57,5%) Patienten ohne vorherige HSCT 10 mg ATG/kg KG, 18 (16,9%) erhielten 20 mg ATG/kg KG und 27 (25,5%) kein ATG ( $p= 0,006$ ).

	Geschlecht	Alter	Erkrankung	TTV-Nachweis vor HSCT	Remissionsstatus zum Zeitpunkt der HSCT	Konditionierungsregime	CMV-Status	ATG Dosierung	frühere STX
Geschlecht		0,327	<b>0,017</b>	0,475	0,977	0,426	0,614	0,890	0,458
Alter			0,111	0,778	0,052	<b>0,000</b>	0,735	0,991	0,906
Erkrankung				<b>0,008</b>	<b>0,000</b>	<b>0,017</b>	0,277	0,503	0,830
TTV-Nachweis vor HSCT					0,940	0,123	0,122	0,756	0,113
Remissionsstatus zum Zeitpunkt der HSCT						<b>0,025</b>	0,479	<b>0,006</b>	0,311
Konditionierungsregime							0,280	0,287	0,063
CMV-Status								0,053	0,444
ATG Dosierung									<b>0,006</b>
frühere STX									

**Table 4: Korrelationsanalyse der Merkmale, die einen signifikanten Einfluss auf die Torque-Teno-Virus (TTV)-Last nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) ausüben.** Dabei sind signifikante P-Werte ( $p < 0,05$ ) rot dargestellt. Auf bestehende Korrelationen wurden überprüft: Geschlecht, Alter, TTV-Nachweis vor HSCT, Remissionsstatus zum Zeitpunkt der HSCT, Konditionierungsregime, Cytomegalievirus (CMV)-Status, Anti-Thymozyten-Globulin (ATG)-Dosierung und frühere Stammzelltransplantation (STX).



In einem weiteren Schritt wurden einfaktorielle ANOVA-Analysen durchgeführt, die den jeweiligen Faktor berechneten, mit dem ein Merkmal die AUC 0-50, 50-100 und 0-300 beeinflusste (Tabelle 5). Dabei war zu erkennen, dass abgesehen von der Erkrankung für die AUC 0-50 keine Signifikanzen vorlagen und sich für die AUC 50-100 und 0-300 dagegen deutliche Signifikanzen finden ließen.

	AUC 0-50	AUC 50-100	AUC 0-300
Remissionsstatus vor HSCT	0,161	0,000	0,000
Konditionierungsregime	0,062	0,007	0,000
ATG-Dosierung	0,084	0,012	0,015
CMV-IgG Serostatus	0,813	0,137	0,014
TTV Nachweis vor HSCT	0,204	0,040	0,011
Erkrankung	0,000	0,012	0,008

**Tabelle 5: Darstellung der P-Werte für die Area under curve (AUC) der Tage 0 bis 50, 50 bis 100 und 0 bis 300 nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) im Hinblick auf die die Torque-Teno-Virus (TTV)-Last signifikant beeinflussenden Merkmale.** Untersucht wurde der Einfluss folgender Merkmale: Remissionsstatus vor HSCT, verwendetes Konditionierungsregime, verabreichte Anti-Thymozyten-Globulin (ATG)-Dosierung, Cytomegalievirus (CMV)-IgG Serostatus, positiver TTV Nachweis vor HSCT und zugrundeliegende Erkrankung. In rot dargestellt sind die signifikanten ( $p < 0,05$ ) P-Werte. Ein signifikanter Einfluss der aufgeführten Merkmale auf die TT-Viruslast tritt in 5 von 6 Fällen (83,3%) erst nach Tag 50 nach HSCT auf.

Mittels einer weiteren statistischen Untersuchung konnte bestätigt werden, dass signifikante Unterschiede größtenteils erst ab Tag 60 nach HSCT auftraten (Tabelle 6). Dabei wurden in 30-Tage-Schritten die TT-Viruslasten der einzelnen Patienten abhängig von ihrer Gruppenzugehörigkeit mittels T-Test untersucht. Für einige Faktoren (ATG-Dosierung, Erkrankung, Remissionsstatus vor HSCT) war eine Häufung höherer Signifikanzen um den Zeitraum von Tag 60-210 auffällig.

Charakteristika	Zeitraum													
	-60 -- -30	-30 - 0	0 - 30	30 - 60	60 - 90	90 - 120	120 - 150	150 - 180	180 - 210	210 - 240	240 - 270	270 - 300	300 - 330	
ATG Dosierung	0,07	0,82	0,31	0,60	0,15	0,20	0,08	0,05	0,10	0,32	0,49	0,41	0,55	
Erkrankung	0,61	0,08	0,47	0,09	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,05	0,02	0,00	0,14	
Remissionsstatus	0,29	0,54	0,82	0,05	0,00	0,01	0,01	0,02	0,01	0,05	0,05	0,10	0,14	
TTV+ vor HSCT	0,13	0,02	0,14	0,00	0,07	0,49	0,29	0,30	0,07	0,08	0,01	0,00	0,14	
Konditionierungsregime	0,21	0,29	0,16	0,17	0,24	0,07	0,12	0,10	0,03	0,20	0,40	0,31	0,19	
CMV Status														
E+S- vs. E-S+	0,18	0,71	0,21	0,35	0,94	0,93	0,78	1,00	0,94	0,67	0,46	0,41	0,57	
E+S- vs. E-S-	0,34	0,32	0,59	0,12	0,07	0,30	0,11	0,12	0,03	0,41	0,18	0,19	0,41	
E-S- vs. E-S+	0,34	0,32	0,59	0,12	0,07	0,30	0,11	0,12	0,03	0,41	0,18	0,19	0,41	
E+S+ vs. E+S-	0,31	0,32	0,62	0,36	0,10	0,12	0,22	0,18	0,02	0,38	0,29	0,33	0,83	
E+S+ vs. E+S-	0,31	0,32	0,62	0,36	0,10	0,12	0,22	0,18	0,02	0,38	0,29	0,33	0,83	
E+S+ vs. E-S-	0,51	0,85	0,44	0,02	0,56	0,45	0,32	0,12	0,36	0,69	0,03	0,04	0,32	

**Tabelle 6: Darstellung der P-Werte einzelner Gruppenvergleiche der Torque-Teno-Virus (TTV)-Last für einen Zeitraum von jeweils 30 Tagen vor und nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT).** Ab dem Tag der allogenen HSCT (Tag 0) wurden die individuellen Viruslasten (Ergebnisse der PCR TT-Viruslast) der Gruppen mit einem T-Test über einen Zeitraum von jeweils 30 Tagen auf signifikante Unterschiede untersucht. Dabei galt es, signifikante Unterschiede durch die Betrachtung singulärer Viruslasten frühzeitig zu erfassen. Ein P-Wert von < 0,05 wird als signifikant angesehen. Nach HSCT traten signifikante Unterschiede in den meisten Fällen erst mit Tag 60 nach HSCT auf.

## 4 Diskussion

Das Torque-Teno-Virus ist ein zur Familie der Anelloviren gehörendes, weltweit hoch prävalentes und mitunter virämisches DNA-Virus. Auch wenn anfänglich ein Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitsbildern vermutet wurde, so ist die aktuell vorherrschende Auffassung, dass TTV keinen Krankheitswert besitzt. TTV konnte in unterschiedlichen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden – von Speichel über Muttermilch, Sperma, Vaginalflüssigkeit und Stuhl hinzu Blut – eine Übertragung ist damit über einen fäkal-oralen, respiratorischen oder sexuellen Weg möglich. Einmal erworben ruft TTV eine jahre- oder lebenslang bestehende Virämie hervor. TTV zeigt sich unempfindlich gegenüber antiviralen Medikamenten und hat einen nicht unerheblichen Stellenwert in der klinisch-diagnostischen Begleitung von Patienten mit Einzelorgantransplantation eingenommen. In diesem Kollektiv hat sich die regelmäßige Erhebung der TT-Viruslast als überaus nützlich erwiesen, um die individuelle immunsuppressive Therapie besser zu justieren [95].

Eines der Ziele unserer Studie war es daher, das Monitoring der TTV-Virämie nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) als prädiktiven Marker für immunbezogene klinische Komplikationen bei einer größeren Kohorte von Patienten mit allogener Stammzelltransplantation zu bewerten. Diesbezüglich lassen sich die Ergebnisse unserer Arbeit wie folgt kurz zusammenfassen: die TT-Viruslast wird multifaktoriell beeinflusst. Dabei hatten das Geschlecht, die zugrunde liegende Erkrankung, der Remissionsstatus vor HSCT, das verwendete Konditionierungsregime und die verabreichte ATG-Dosis, der CMV-IgG Serostatus von Spender und Empfänger und ein positiver TTV-Nachweis vor HSCT einen signifikanten Einfluss auf die TT-Viruslast. Aber auch die übrigen, von uns untersuchten Faktoren (insbesondere die klinischen Endpunkte wie z.B. das Auftreten einer GvHD oder eines Rezidivs) bewirkten – wenn auch nicht signifikant – eine Veränderung der TT-Viruslast.

Gegenüber den bisher publizierten TTV-Studien zu diesem Patientenkollektiv sehen wir als besonderes Merkmal unserer Studie, dass wir innerhalb eines großen Kollektivs ( $n=123$ ) sehr viele Patienten einschließen konnten, von denen vor, während und bis zu 300 Tage nach HSCT TT-Viruslastmengen gemessen werden konnten. Damit war es möglich, eine statistisch relevante Anzahl von Patienten im Hinblick auf mehrere neue klinische Marker und Merkmale und ihres Einflusses auf die TT-Viruslast hin zu untersuchen. Unsere Studie ist größer als die Studien anderer Arbeitsgruppen wie die retrospektive Studie von Albert et al. ( $n=72$ ) [100] und die prospektive Studie von Wohlfahrt et al. ( $n=50$ ) [99] und fast genauso groß wie die von Masouridi-Levrat et al. [90].

Unsere Studie wurde als eine retrospektive Studie konzipiert, weil wir damit über einen definierten Zeitraum klinische Analysen mit vielen Messpunkten durchführen konnten. Um den Bedingungen einer prospektiven Studie so nahe wie möglich zu kommen und um Selektionsverzerrungen zu vermeiden, wurden alle Patienten einer hämatologischen Station während eines

definierten Zeitraums (September 2015 bis April 2018) in unsere Studie eingeschlossen. Unserer Auffassung nach besteht ein wesentlicher Vorteil dieses Verfahrens darin, dass die Gesamtmenge der Proben ( $n= 2054$ ) in einem kurzen Zeitraum in großen Serien untersucht werden und dadurch methodische Schwankungen etwa durch Reagenzien-Chargenwechsel niedrig gehalten werden konnten. Demzufolge haben wir geringere intra- und inter-assay Varianzen zu erwarten als dies in prospektiven Studien möglich wäre. Die von uns durchgeführte retrospektive Bestimmung der TT-Viruslasten unterscheidet sich hinsichtlich der methodischen Herangehensweise nicht von der einer prospektiven Studie, die auch in einer routinemäßigen TTV-Bestimmung zusammen mit dem üblichen Monitoring von Viruslasten nach Stammzelltransplantation besteht.

Eine Einschränkung unserer Studie sehen wir in der heterogenen Patientenpopulation, aber gleichzeitig spiegelt eben genau diese die typische Situation auf einer hämatologischen Station wider, für deren Behandlung und Steuerung der Wert der Bestimmung der TT-Viruslast bewertet werden sollte. Darüber hinaus erbrachte selbst die separate Analyse der allein 97 myeloischen Patienten keine signifikanten Ergebnisse hinsichtlich der Verwendung der TT-Viruslast als prognostischer Marker. Zum Beispiel untersuchten wir allein bei Patienten mit einer myeloischen Grunderkrankung den Einfluss von ATG-Dosierung und GvHD-Prophylaxe sowie den Einfluss des Auftretens einer GvHD und eines Rezidivs auf die TT-Viruslast. Indem wir die myeloischen und lymphatischen Kollektive unabhängig voneinander analysierten, konnten wir das Kollektiv in sich homogener gestalten.

Die Bedeutung der TT-Viruslastbestimmung als nützlicher Marker für die Kontrolle der Immunkompetenz und zur Steuerung immunsuppressiver Erhaltungstherapien bei Einzelorgantransplantationsempfängern wurde schon beschrieben [3, 92, 94–96, 105]. Im Gegensatz dazu gibt es begrenzte Informationen mit teilweise widersprüchlichen Ergebnissen darüber, ob auch allogene HSCT-Empfänger von einer regelmäßigen Überwachung der TT-Viruslast profitieren würden und ob hier eine frühzeitige Vorhersage klinisch relevanter Zwischenfälle möglich wäre [91, 99, 101, 106, 107].

Der Rückgang der Plasma-TT-Viruslast kurz nach der Konditionierung gefolgt von einem kontinuierlichen Anstieg, der seinen Höhepunkt etwa 90 Tage nach der Transplantation erreicht, wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet [101]. Es ist allgemein anerkannt, dass Lymphozyten die replikationskompetenten Zellen für TTV darstellen [33, 34, 37], sodass die Repopulation dieser Zellen nach HSCT das Reservoir für die TTV-Replikation erweitert. Eines der grundlegenden Probleme der Messung der TT-Viruslast nach HSCT könnte also die Tatsache sein, dass die T-Lymphozyten im Rahmen einer Stammzelltransplantation zu den Zellen gehören, die fast vollständig dezimiert werden und erst im Rahmen des Engraftments zu normalen Werten zurückkehren. Dies steht im Gegensatz zu der Situation bei der Transplantation einzelner Organe, bei der auch die TTV-produzierenden Zellen, d.h. Lymphozyten, zwar durch

immunsuppressive Therapien geschwächt werden, jedoch nicht in dem Maße, wie es im Rahmen der HSCT sichtbar ist.

### 4.1 Einflussfaktoren auf die Höhe der TT-Viruslast

Unsere Ergebnisse knüpfen an die anderer Arbeitsgruppen an. Wie durch Wohlfarth et al. beschrieben [99], haben auch wir beobachten können, dass unabhängig von einem positiven oder negativen TTV-Nachweis vor HSCT bei allen Patienten nach HSCT TTV im Blutserum detektierbar war. Es wird vermutet, dass eine Transfusion infizierter Blutprodukte oder eines infizierten Stammzelltransplantates mögliche Infektionswege darstellen. Darüber hinaus haben wir untersucht, wie sich die TT-Viruslast verhält, in Abhängigkeit davon, ob bereits vor Stammzelltransplantation TTV im Blut der Patienten nachgewiesen werden konnte. Während innerhalb der Gruppe der TTV Negativen ein anfänglich steilerer Anstieg der TT-Viruslast verzeichnet werden konnte, zeigte die Gruppe der TTV Positiven im weiteren Beobachtungszeitraum von 300 Tagen signifikant höhere TT-Viruslasten. Somit wäre es im Falle eines routinemäßigen Klinikeinsatzes entscheidend zu wissen, inwieweit sich die TTV Ausgangssituation vor Transplantation darstellt, da ansonsten Verzerrungen bei einem möglichen Interpretationsversuch der TT-Viruslast nach HSCT zu befürchten wären.

In unserer Studie hatten Patienten mit lymphatischen Erkrankungen signifikant häufiger nachweisbare TTV-Werte vor HSCT als Patienten mit myeloischen Erkrankungen. Gleichzeitig wiesen Patienten mit einer zugrundeliegenden lymphatischen Erkrankung sowohl vor als auch nach HSCT signifikant höhere TT-Viruslasten auf. Masouridi-Levrat et al. hoben dabei insbesondere die erhöhte TT-Virusbelastung bei Patienten mit ALL oder NHL hervor, wohingegen bei Patienten mit anderen Malignomen die TT-Viruslast im Normbereich lag [90].

Wir haben diesen Effekt zum einen damit erklärt, dass die Lymphozyten den Wirt des TT-Virus darstellen und eine höhere Anzahl an Lymphozyten mehr Möglichkeiten zur Replikation bietet. Gleichzeitig vermuten wir, dass eine pathologisch gesteigerte Lymphozytenproliferation ebenfalls eine potentiell erhöhte Replikation des TTVs zur Folge hat. Der signifikante Unterschied der TT-Viruslast zwischen den myeloisch und lymphatisch erkrankten Patienten wurde jedoch erst um Tag 50 nach HSCT deutlich, aber anders als in der Arbeitsgruppe um Wohlfarth et al. zeigte sich bei unseren Ergebnissen keine Annäherung der TT-Viruslast über die Zeit. Patienten mit einer zugrundeliegenden lymphatischen Erkrankung zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg eine höhere Viruslast. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass trotz eines „neuen“ Immunsystems eine gewisse Fehlprogrammierung der Lymphozyten oder des TTVs erhalten bleibt und damit eine weiterhin ausgeprägte Replikation ermöglicht wird. Um das Problem möglicher Einflüsse der TTV-Virämie vor HSCT auf die Kinetik nach HSCT zu umgehen, haben Wohlfarth et al. in ihrer Studie nur die Untergruppe der Patienten mit positiver

TTV-DNA zu Studienbeginn einbezogen [99], was zu einer Einschränkung ihrer Anwendbarkeit als klinischer Marker führt. Um die Frage zu klären, inwieweit die alleinige Untersuchung der myeloisch erkrankten Patienten zu signifikanten Unterschieden beitragen würde, wurden einige der bereits angestellten Gruppenvergleiche nur mit dem Kollektiv der 97 myeloisch erkrankten Patienten wiederholt. Auch der Ausschluss der lymphatisch erkrankten Patienten und der damit signifikant höheren TT-Viruslasten konnte keine bis dato verdeckten Signifikanzen aufdecken.

Vergleichbar zu dem TTV Status vor HSCT, handelt es sich auch bei der zu behandelnden Grunderkrankung um einen nicht veränderbaren Faktor, der einen anhaltenden und signifikanten Einfluss auf die TT-Viruslast nach HSCT ausübt und iatrogen nicht beeinflusst werden kann. Damit wird deutlich, dass wenn man sich des TT-Viruslast Monitorings nach HSCT bedienen wollen würde, müssten zu Beginn zunächst eine Reihe von Merkmalen erhoben werden, in dem Wissen, dass bei bestimmten Patienteneigenschaften, z.B. Mann, älter als 60, TTV positiv vor HSCT, lymphatische Grunderkrankung, von vornherein mit erhöhten TT-Viruslasten nach HSCT zu rechnen wäre. Auch wenn bereits zahlreiche signifikante wie nicht signifikante Einflussfaktoren auf die TT-Viruslast identifiziert werden konnten, so bleibt letzten Endes ungewiss, welche weiteren Faktoren existieren und welchen Einfluss sie auf die TT-Viruslast ausüben. Bei den von uns untersuchten Patienten zeigte sich vor und nach HSCT eine multifaktorielle Beeinflussung der TT-Viruslast. Dabei war aber eine klare Separierung der Einflussfaktoren voneinander nur schwer möglich, da unsere Untersuchungen auf eine wechselseitige Beeinflussung der Faktoren hindeuten. Und sollte versucht werden, gewisse Patientengruppen auszuschließen – wie es Wohlfarth et al. in ihrer Studie unternommen haben [99] – führt dies wiederum zu einem immer kleiner werdenden Patientenkreis, für den die Anwendbarkeit dieses Markers überhaupt in Frage käme.

Neben dem vorausgegangenen TTV Status vor Stammzelltransplantation und der zugrundeliegenden Erkrankung konnten wir weitere Faktoren identifizieren, die einen signifikanten Einfluss auf die Kinetik der TT-Viruslast ausübten. Myeloablative Konditionierungsregime, eine höhere ATG-Dosis und eine vollständige Remission vor HSCT waren mit signifikant höheren TT-Viruslasten verbunden. Der Einfluss von ATG auf die TT-Viruslast wurde von Focosi et al. [83] beschrieben und zeigte, dass ATG eine transiente Unterdrückung der TTV-Virämie verursacht. Im weiteren Verlauf nach Stammzelltransplantation konnten wir allerdings sehen, dass eine aggressivere und stärker immunsupprimierende Therapie einen Anstieg der TT-Viruslast zur Folge hat, was nach bisheriger Erkenntnis Ausdruck einer schlechteren Immunkontrolle des Virus seitens des Immunsystems ist. Eine höhere ATG-Dosis (20 mg/kg KG) bewirkt eine intensivere Immunsuppression als eine niedrigere Dosis, gemessen an der TT-Viruslast. Die Unterschiede werden in unseren Untersuchungen dann erkennbar, wenn die anfängliche Toxizität der Konditionierung nachgelassen hat und die eigentliche Immunrekonstitution beginnt. Es gelang aber keine Identifikation gezielter Cut-Off-Werte der TT-Viruslast, deren Überschreiten eine nicht ef-

fiziente Immunkompetenz widerspiegeln würde und damit prädisponierend für den Eintritt von Komplikationen wäre.

Geschlecht, Remissionsstatus vor HSCT, verwendetes Konditionierungsregime, verabreichte ATG-Dosis, CMV-IgG Serostatus von Spender und Empfänger und positiver TTV-Nachweis vor HSCT übten noch bis Tag 300 nach HSCT einen Einfluss auf die TT-Viruslast aus und dieser Effekt schien über die Zeit nicht abzunehmen. Ganz im Gegenteil: wir konnten bei all diesen Faktoren feststellen, dass ein signifikanter Einfluss auf die TT-Viruslast erst im weiteren Verlauf nach Tag 50 nach HSCT sichtbar wurde und sich damit die Frage stellt, inwieweit ein frühzeitiges Erfassen der TT-Viruslast tatsächlich von klinischem Nutzen ist und dazu dienen kann, Aussagen über den weiteren Verlauf zu treffen.

## 4.2 TTV als Biomarker

Die ersten 100 Tage nach HSCT sind klinisch von außerordentlicher Relevanz - zum Beispiel in Bezug auf das Auftreten einer aGvHD. Da wir jedoch im Median an Tag 32 nach HSCT bei TTV-positiven Patienten und an Tag 41 nach HSCT bei TTV-negativen Patienten einen konsequenten Anstieg der TT-Viruslast beobachten konnten, haben wir uns entschlossen, innerhalb der ersten 100 Tage zwei noch präzisere Zeitintervalle zu bilden. Die AUC 0-50 deckte somit einen Zeitbereich ab, in dem die TT-Viruslast nur langsam zu steigen begann. Die folgende AUC 50-100 wiederum erfasste die nächsten 50 Tage, innerhalb derer signifikante Unterschiede auftreten müssten, um frühzeitig eine Aussage über den Beginn möglicher Komplikationen treffen zu können. Um einen Überblick der TT-Viruslast über den gesamten Beobachtungszeitraum zu geben und um potenziell auftretende höhergradige Veränderungen über den 100. Tag nach HSCT hinaus zu erfassen, wurde für alle 123 Patienten zusätzlich die AUC 0-300 bestimmt. Neben dem Vergleich der Gesamtviruslasten innerhalb eines definierten Zeitraumes (ausgedrückt in den AUC Zahlenwerten) zogen wir zusätzlich die tatsächlich ermittelten einzelnen PCR-TT-Viruslastwerte zur Bestätigung unserer Ergebnisse heran (Tabelle 6). Für einige Faktoren fanden wir ein Cluster mit höheren Signifikanzen um Tag 60-210 nach HSCT. Bei keiner der verwendeten Strategien konnte ein Zeitpunkt gefunden werden, an dem die Bestimmung der TT-Viruslast unabhängig von den von uns definierten Einflussfaktoren als prognostischer Marker für klinische Komplikationen dienen konnte.

Es wäre wünschenswert und war eines der Ziele dieser Studie, einen Labormarker zu definieren, um das Risiko klinisch relevanter Komplikationen vorherzusagen. Dies wäre der Fall, wenn die Kinetik der TTV-DNAämie den Grad der gesamten Immunkompetenz widerspiegeln würde. Eine frühzeitige Prognosestellung hinsichtlich des weiteren klinischen Verlaufes und damit eines möglichen Erkennens von einer drohenden GvHD oder einer CMV/EBV Virusreaktivierung, eines bevorstehenden Rezidivs oder eines möglichen Versterbens durch Monitoring der TT-Viruslast



kann nach unserer Erkenntnis aber nicht vorgenommen werden. Klinisch entscheidende Ereignisse spiegeln sich in unseren Ergebnissen in nicht signifikanten Unterschieden wider. Gleiches galt auch für die Untergruppe der Patienten mit schwereren Virus-Reaktivierungen (definiert als Viruslasten  $> 1000$  Kopien/ml).

CMV ist ein starkes entzündungsförderndes und immunsuppressives Agens und kann als solches die TTV-DNA-Belastung im Blut modulieren. Tatsächlich scheinen CMV-seropositive gesunde Individuen zumindest in bestimmten Altersgruppen eine höhere Plasma-TTV-DNA-Last als ihre seronegativen CMV-Pendants zu zeigen. Trotzdem fanden wir keine Hinweise darauf, dass die CMV-Replikation innerhalb der ersten 50 Tage der allogenen HSCT einen Einfluss auf die TTV DNA-Last-Kinetik haben könnte. Einige Autoren haben eine direkte Korrelation zwischen der TTV DNA AUC 20-30 und CMV-spezifischen Interferon- $\gamma$  CD8 $^+$  T-Zellzahlen bis zum Tag +30 beschrieben, haben aber dennoch herausgefunden, dass dieser Parameter nicht nützlich war, um das Auftreten eines CMV- oder EBV-Rezidivs zu vermeiden [90].

Einige Arbeitsgruppen kamen zu dem Schluss, dass Patienten nach HSCT, die in den ersten 100 Tagen nach allogener HSCT von persistierenden Virusinfektionen und/oder einer GvHD betroffen waren, signifikant höhere mediane TTV-Lasten am Tag 30 nach HSCT aufwiesen als Patienten ohne klinische Komplikationen [106]. Anders als Albert et al. wie auch Gilles et al., die Tag 30 nach HSCT als entscheidend zur Vorhersage klinischer Komplikationen eingestuft haben [100, 106], haben wir beobachten können, dass ein erster Nachweis und Anstieg der TT-Viruslast bei über der Hälfte unseres untersuchten Kollektivs erst nach Tag 30 nach HSCT erfolgte und somit bei dem überwiegenden Teil der Patienten innerhalb des ersten Monats nach HSCT keine nennenswerte TT-Viruslast zu verzeichnen war. Überdies konnten signifikante Unterschiede erst mit Tag 50 nach HSCT beobachtet werden können. Dies würde der Theorie widersprechen, dass insbesondere die TT-Viruslast innerhalb der ersten Tage und Wochen nach HSCT von entscheidender Bedeutung sei, um dadurch ein etwaiges Risiko für die Entwicklung klinisch relevanter Zwischenfälle zu ermitteln und ein rechtzeitiges Einschreiten und Entgegenwirken zu ermöglichen. Nach unseren Erkenntnissen würde der Großteil der Patienten von einer fortlaufenden Kontrolle der TT-Viruslast innerhalb des ersten Monats nach HSCT nicht profitieren, da die TT-Viruslast erst mit dem Beginn der Immunrekonstruktion und einer damit verbundenen Zunahme der Lymphozytenzahl zu steigen beginnt.

Wohlfarth et al. fanden eine signifikante Korrelation der TTV-Werte mit absoluten Lymphozytenzahlen nach der Transplantation und mit CMV- und EBV-Viruslasten während der Phasen der Virämie, aber immunbezogene klinische Ereignisse konnten mit den TTV-Werten nicht vorhergesagt werden [99]. Auch als Marker für die Überwachung des Anwachsens des Knochenmarks scheidet TTV in unseren Augen aus, da die Leukozytenrekonstruktion bereits vor dem ersten Anstieg der TT-Viruslast vollzogen ist. In den von uns beobachteten 300 Tagen nach HSCT (unter Nichtberücksichtigung der Anfangsphase) fanden sich keine Korrelationen zwischen dem



Verlauf der TT-Viruslast und der Immunwerte (T-Zell-, T-Suppressorzell-, T-Helferzell-, NK-Zell-, B-Zell-, und Lymphozytenzellzahl), sodass uns dies zu dem Schluss kommen lässt, dass die Immunlage der Patienten im Verlauf nach HSCT nicht verlässlich durch die TT-Viruslast abgebildet werden kann. Damit gelingt keine suffiziente Kontrolle der Immunlage der Patienten durch Monitoring der TT-Viruslast weder in der Anfangsphase, noch im weiteren Verlauf nach HSCT, ebenso wenig wie die Vorhersage einer Virusreaktivierung, einer GvHD, eines Rezidivs und des Versterbens des Patienten.

Focosi et al. sind bei ihrem Kollektiv von autolog stammzelltransplantierten Patienten davon ausgegangen, dass eine Wiederkehr zu den TTV-Basalwerten das Erreichen des für diesen Patienten besten Immunstatus bedeutet [83]. In dem von uns untersuchten Kollektiv von allogenen stammzelltransplantierten Patienten haben wir diese Theorie nicht bestätigen können. Dies könnte der Tatsache geschuldet sein, dass der von uns ermittelte Ausgangs- oder Basalwert vor HSCT noch in dem Patienten eigenen Immunsystem bestimmt wurde, wohingegen die Messung der TT-Viruslast am Ende des Beobachtungszeitraumes in dem „neuen“ Immunsystem erfolgte.

### 4.3 Fazit

Aus unserer Betrachtung der Wechselwirkung der Einflussfaktoren schließen wir, dass es in jedem Fall unerlässlich ist, ein breites Spektrum an klinischen Daten zu analysieren. Andernfalls besteht ein hohes Risiko, falsche Rückschlüsse zu ziehen, welche Faktoren die TT-Virusbelastung tatsächlich kausal beeinflussen. So konnten wir zeigen, dass in unserer Studie Männer häufiger an lymphatischen Erkrankungen litten und dass Patienten mit lymphatischen Erkrankungen häufiger ein myeloablatives Konditionierungsschema hatten. Darüber hinaus waren Patienten mit lymphatischen Erkrankungen häufiger TTV-positiv vor HSCT, was unterstreicht, dass mehrere Faktoren in gegenseitiger Abhängigkeit existieren, die die TT-Viruslast beeinflussen.

Zusammenfassend deuten die Daten der vorliegenden Studie darauf hin, dass ein multifaktorieller Einfluss das Niveau und die Kinetik der TT-Viruslast bestimmt. Die TT-Virusbelastung nach HSCT wird signifikant durch Grunderkrankungen, Vorbehandlung, Konditionierung und immunsuppressive Maßnahmen beeinflusst. Im Gegensatz dazu konnten Virusreaktivierungen, GvHD und klinische Ereignisse nicht durch die Überwachung der TTV-Virämie vorhergesagt werden. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse kommen wir zu dem Schluss, dass – anders als bei Patienten nach solider Organtransplantation – die konsequente Bestimmung der TT-Viruslast bei allogenen stammzelltransplantierten Patienten klinisch nur begrenzt von Nutzen ist. Wir sind nicht sehr zuversichtlich, dass TTV als Marker für den Grad der Immunsuppression oder als prognostischer Marker für klinisch kritische Ereignisse nach HSCT geeignet ist. Dabei stellt sich die Frage, inwieweit überhaupt in dem heterogenen Kollektiv der allogenen stammzelltransplantierten Patienten ein Virus als Marker genutzt werden kann, der in einer Zellpopulation

repliziert, die im Rahmen des Konditionierungsregimes gezielt dezimiert wird (und damit eine variable Größe darstellt). TTV hat bei Patienten mit Einzelorgantransplantationen seinen Stellenwert als Biomarker unter Beweis gestellt, sodass in weiteren Untersuchungen die Bedeutung TTVs als nutzbarer Parameter zur Beurteilung der Immunmodulation sicherlich noch weiter herausgearbeitet wird.

# Literaturverzeichnis

- [1] FAUQUET, Claude M. ; MAYO, M. A. ; MANILOFF, J. ; DESSELBERGER, U. ; BALL, L. A.: *Virus Taxonomy : VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Burlington : Elsevier, 2005 <http://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=405647>. – ISBN 9780123847263 0123847265
- [2] DELWART, Eric ; LI, Linlin: Rapidly expanding genetic diversity and host range of the Circoviridae viral family and other Rep encoding small circular ssDNA genomes. In: *Virus research* 164 (2012), Nr. 1-2, S. 114–121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2011.11.021>. – DOI 10.1016/j.virusres.2011.11.021
- [3] DE VLAMINCK, I. ; KHUSH, K. ; STREHL, C. ; KOHLI, B. ; LUIKART, H. ; NEFF, N. ; OKAMOTO, J. ; SNYDER, T. ; CORNFIELD, D. ; NICOLLS, M. ; WEILL, D. ; BERNSTEIN, D. ; VALANTINE, H. ; QUAKE, S.: Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. In: *Cell* 155 (2013), Nr. 5, S. 1178–1187. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.034>. – DOI 10.1016/j.cell.2013.10.034
- [4] FREER, G. ; MAGGI, F. ; PIFFERI, M. ; DI CICCIO, M. ; PERONI, D. ; PISTELLO, M.: The Virome and Its Major Component, Anellovirus, a Convoluting System Molding Human Immune Defenses and Possibly Affecting the Development of Asthma and Respiratory Diseases in Childhood. In: *Frontiers in microbiology* 9 (2018), S. 686. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.00686>. – DOI 10.3389/fmicb.2018.00686. – ISSN 1664–302X
- [5] ROSARIO, K. ; DUFFY, S. ; BREITBART, M.: A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: insights gained from metagenomics. In: *Archives of virology* 157 (2012), Nr. 10, S. 1851–1871. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-012-1391-y>. – DOI 10.1007/s00705-012-1391-y
- [6] ROSARIO, K. ; SCHENCK, R. ; HARBEITNER, R. ; LAWLER, S. ; BREITBART, M.: Novel circular single-stranded DNA viruses identified in marine invertebrates reveal high sequence diversity and consistent predicted intrinsic disorder patterns within putative structural proteins. In: *Frontiers in microbiology* 6 (2015), S. 696. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00696>. – DOI 10.3389/fmicb.2015.00696
- [7] FOCOSI, D. ; ANTONELLI, G. ; PISTELLO, M. ; MAGGI, F.: Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 22 (2016), Nr. 7, S. 589–593. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.04.007>. – DOI 10.1016/j.cmi.2016.04.007

- [8] PHAN, T. G. ; MORI, D. ; DENG, X. ; RAJINDRAJITH, S. ; RANAWAKA, U. ; FAN NG, T. ; BUCARDO-RIVERA, F. ; ORLANDI, P. ; AHMED, K. ; DELWART, E.: Small circular single stranded DNA viral genomes in unexplained cases of human encephalitis, diarrhea, and in untreated sewage. In: *Virology* 482 (2015), S. 98–104. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.011>. – DOI 10.1016/j.virol.2015.03.011
- [9] FOULONGNE, V. ; SAUVAGE, V. ; HEBERT, C. ; DEREURE, O. ; CHEVAL, J. ; GOUILH, M. ; PARIENTE, K. ; SEGONDY, M. ; BURGUIÈRE, A. ; MANUGUERRA, J. ; CARO, V. ; ELOIT, M.: Human skin microbiota: high diversity of DNA viruses identified on the human skin by high throughput sequencing. In: *PloS one* 7 (2012), Nr. 6, S. e38499. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0038499>. – DOI 10.1371/journal.pone.0038499
- [10] VAN TAN ; VAN DOORN, H. ; NGHIA, H. ; CHAU, T. ; LE TU, T. ; DE VRIES, M. ; CANUTI, M. ; DEIJS, M. ; JEBBINK, M. ; BAKER, S. ; BRYANT, J. ; THAM, N. ; BKRONG, N. ; BONI, M. ; LOI, T. ; LE PHUONG, T. ; VERHOEVEN, J. ; CRUSAT, M. ; JEENINGA, R. ; SCHULTSZ, C. ; VAN CHAU, N. ; HIEN, T. ; VAN DER HOEK, L. ; FARRAR, J. ; DE JONG, M.: Identification of a new cyclovirus in cerebrospinal fluid of patients with acute central nervous system infections. In: *mBio* 4 (2013), Nr. 3, S. e00231–13. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00231-13>. – DOI 10.1128/mBio.00231-13
- [11] ZHOU, Chenglin ; ZHANG, Shibing ; GONG, Qin ; HAO, Aimin: A novel gemycircularvirus in an unexplained case of child encephalitis. In: *Virology journal* 12 (2015), S. 197. <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-015-0431-0>. – DOI 10.1186/s12985-015-0431-0
- [12] SAUVAGE, V. ; CHEVAL, J. ; FOULONGNE, V. ; GOUILH, M. ; PARIENTE, K. ; MANUGUERRA, J. ; RICHARDSON, J. ; DEREURE, O. ; LECUIT, M. ; BURGUIERE, A. ; CARO, V. ; ELOIT, M.: Identification of the first human gyrovirus, a virus related to chicken anemia virus. In: *Journal of virology* 85 (2011), Nr. 15, S. 7948–7950. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00639-11>. – DOI 10.1128/JVI.00639-11
- [13] PHAN, T. G. ; DA COSTA, A. C. ; DEL VALLE MENDOZA, J. ; BUCARDO-RIVERA, F. ; NORDGREN, J. ; O'RYAN, M. ; DENG, X. ; DELWART, E.: The fecal virome of South and Central American children with diarrhea includes small circular DNA viral genomes of unknown origin. In: *Archives of virology* 161 (2016), Nr. 4, S. 959–966. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-016-2756-4>. – DOI 10.1007/s00705-016-2756-4
- [14] OKAMOTO, H.: TT viruses in animals. In: *Current topics in microbiology and immunology* 331 (2009), S. 35–52. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-70972-5\\_3](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-70972-5_3). – DOI 10.1007/978-3-540-70972-5\_3

- [15] BIAGINI, P.: Classification of TTV and related viruses (anelloviruses). In: *Current topics in microbiology and immunology* 331 (2009), S. 21–33. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-70972-5\\_2](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-70972-5_2). – DOI 10.1007/978-3-540-70972-5\_2. – ISSN 0070-217X
- [16] INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES ; KING, A.M.Q. ; ADAMS, M. J. ; LEFKOWITZ, E. ; CARSTENS, E. B.: *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Science, 2011 (Immunology and microbiology). <https://books.google.de/books?id=KXRCYay3pH4C>. – ISBN 9780123846846
- [17] VILLIERS, E. de ; BORKOSKY, S. ; KIMMEL, R. ; GUNST, K. ; FEI, J.-W.: The diversity of torque teno viruses: in vitro replication leads to the formation of additional replication-competent subviral molecules. In: *Journal of virology* 85 (2011), Nr. 14, S. 7284–7295. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02472-10>. – DOI 10.1128/JVI.02472-10
- [18] LEPPIK, Ludmila ; GUNST, Karin ; LEHTINEN, Matti ; DILLNER, Joakim ; STREKER, Karin ; VILLIERS, Ethel-Michele de: In vivo and in vitro intragenomic rearrangement of TT viruses. In: *Journal of virology* 81 (2007), Nr. 17, S. 9346–9356. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00781-07>. – DOI 10.1128/JVI.00781-07
- [19] HUANG, Yao-Wei ; HARRALL, Kylie K. ; DRYMAN, Barbara A. ; OPRIESSNIG, Tanja ; VAUGHN, Eric M. ; ROOF, Michael B. ; MENG, Xiang-Jin: Serological profile of torque teno sus virus species 1 (TTSuV1) in pigs and antigenic relationships between two TTSuV1 genotypes (1a and 1b), between two species (TTSuV1 and -2), and between porcine and human anelloviruses. In: *Journal of virology* 86 (2012), Nr. 19, S. 10628–10639. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00176-12>. – DOI 10.1128/JVI.00176-12
- [20] TAKAHASHI, K. ; IWASA, Y. ; HIJIKATA, M. ; MISHIRO, S.: Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. In: *Archives of virology* 145 (2000), Nr. 5, S. 979–993. <http://dx.doi.org/10.1007/s007050050689>. – DOI 10.1007/s007050050689
- [21] NINOMIYA, M. ; TAKAHASHI, M. ; SHIMOSEGAWA, T. ; OKAMOTO, H.: Analysis of the entire genomes of fifteen torque teno midi virus variants classifiable into a third group of genus Anellovirus. In: *Archives of virology* 152 (2007), Nr. 11, S. 1961–1975. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-007-1046-6>. – DOI 10.1007/s00705-007-1046-6
- [22] SPANDOLE, S. ; CIMPONERIU, D. ; BERCA, L. ; MIHĂESCU, G.: Human anelloviruses: an update of molecular, epidemiological and clinical aspects. In: *Archives of virology* 160 (2015), Nr. 4, S. 893–908. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-015-2363-9>. – DOI 10.1007/s00705-015-2363-9
- [23] HELLER, F. ; ZACHOVAL, R. ; KOELZER, A. ; NITSCHKO, H. ; FROESNER, G. G.: Isolate KAV: a new genotype of the TT-virus family. In: *Biochemical and biophysical research*

- communications* 289 (2001), Nr. 5, S. 937–941. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2001.6089>. – DOI 10.1006/bbrc.2001.6089
- [24] MIYATA, H. ; TSUNODA, H. ; KAZI, A. ; YAMADA, A. ; KHAN, M. A. ; MURAKAMI, J. ; KAMAHORA, T. ; SHIRAKI, K. ; HINO, S.: Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. In: *Journal of virology* 73 (1999), Nr. 5, S. 3582–3586
- [25] PENG, Y. H. ; 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. In: *Archives of virology* 147 (2002), Nr. 1, S. 21–41. <http://dx.doi.org/10.1007/s705-002-8301-7>. – DOI 10.1007/s705-002-8301-7
- [26] NINOMIYA, M. ; NISHIZAWA, T. ; TAKAHASHI, M. ; LORENZO, F. R. ; SHIMOSEGAWA, T. ; OKAMOTO, H.: Identification and genomic characterization of a novel human torque teno virus of 3.2 kb. In: *The Journal of general virology* 88 (2007), Nr. Pt 7, S. 1939–1944. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.82895-0>. – DOI 10.1099/vir.0.82895-0
- [27] OKAMOTO, H. ; NISHIZAWA, T. ; TAKAHASHI, M. ; TAWARA, A. ; PENG, Y. ; KISHIMOTO, J. ; WANG, Y.: Genomic and evolutionary characterization of TT virus (TTV) in tupaia and comparison with species-specific TTVs in humans and non-human primates. In: *The Journal of general virology* 82 (2001), Nr. Pt 9, S. 2041–2050. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-82-9-2041>. – DOI 10.1099/0022-1317-82-9-2041
- [28] NISHIZAWA, T. ; OKAMOTO, H. ; TSUDA, F. ; AIKAWA, T. ; SUGAI, Y. ; KONISHI, K. ; AKAHANE, Y. ; UKITA, M. ; TANAKA, T. ; MIYAKAWA, Y. ; MAYUMI, M.: Quasispecies of TT virus (TTV) with sequence divergence in hypervariable regions of the capsid protein in chronic TTV infection. In: *Journal of virology* 73 (1999), Nr. 11, S. 9604–9608
- [29] HINO, Shigeo: TTV, a new human virus with single stranded circular DNA genome. In: *Reviews in medical virology* 12 (2002), Nr. 3, S. 151–158. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.351>. – DOI 10.1002/rmv.351
- [30] LEARY, Thomas P. ; ERKER, James C. ; CHALMERS, Michelle L. ; DESAI, Suresh M. ; MUSHAHWAR, Isa K.: Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. In: *The Journal of general virology* 80 ( Pt 8) (1999), S. 2115–2120. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-80-8-2115>. – DOI 10.1099/0022-1317-80-8-2115. – ISSN 0022-1317
- [31] BIAGINI, P. ; GALLIAN, P. ; ATTOUI, H. ; CANTALOUBE, J. F. ; MICCO, P. de ; LAMBALLERIE, X. de: Determination and phylogenetic analysis of partial sequences from TT virus isolates. In: *The Journal of general virology* 80 ( Pt 2) (1999), S. 419–424.

<http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-80-2-419>. – DOI 10.1099/0022-1317-80-2-419. – ISSN 0022-1317

- [32] LUO, Kangxian ; HE, Haitang ; LIU, Zhihua ; LIU, Dingxie ; XIAO, Hong ; JIANG, Xiaojing ; LIANG, Weifang ; ZHANG, Lian: Novel variants related to TT virus distributed widely in China. In: *Journal of medical virology* 67 (2002), Nr. 1, S. 118–126. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.2200>. – DOI 10.1002/jmv.2200. – ISSN 0146-6615
- [33] MAGGI, F. ; FORNAI, C. ; ZACCARO, L. ; MORRICA, A. ; VATTERONI, M. L. ; ISOLA, P. ; MARCHI, S. ; RICCHIUTI, A. ; PISTELLO, M. ; BENDINELLI, M.: TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells. In: *Journal of medical virology* 64 (2001), Nr. 2, S. 190–194. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.1035>. – DOI 10.1002/jmv.1035. – ISSN 0146-6615
- [34] MARISCAL, L. F. ; LÓPEZ-ALCOROCHO, J. M. ; RODRÍGUEZ-IÑIGO, E. ; ORTIZ-MOVILLA, N. ; LUCAS, S. de ; BARTOLOMÉ, J. ; CARREÑO, V.: TT virus replicates in stimulated but not in nonstimulated peripheral blood mononuclear cells. In: *Virology* 301 (2002), Nr. 1, S. 121–129. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.2002.1545>. – DOI 10.1006/viro.2002.1545
- [35] 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. In: *Journal of medical virology* 58 (1999), Nr. 2, S. 174–177. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9071\(199906\)58:2<174::aid-jmv12>3.0.co;2-x](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1096-9071(199906)58:2<174::aid-jmv12>3.0.co;2-x). – DOI 10.1002/(sici)1096-9071(199906)58:2<174::aid-jmv12>3.0.co;2-x
- [36] MAGGI, F. ; FOCOSI, D. ; ALBANI, M. ; LANINI, L. ; VATTERONI, M. ; PETRINI, M. ; CECCHERINI-NELLI, L. ; PISTELLO, M. ; BENDINELLI, M.: Role of hematopoietic cells in the maintenance of chronic human torquetenovirus plasma viremia. In: *Journal of virology* 84 (2010), Nr. 13, S. 6891–6893. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00273-10>. – DOI 10.1128/JVI.00273-10
- [37] FOCOSI, D. ; MACERA, L. ; BOGGI, U. ; NELLI, L. C. ; MAGGI, F.: Short-term kinetics of torque teno virus viraemia after induction immunosuppression confirm T lymphocytes as the main replication-competent cells. In: *The Journal of general virology* 96 (2015), Nr. Pt 1, S. 115–117. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.070094-0>. – DOI 10.1099/vir.0.070094-0
- [38] GALMÈS, J. ; LI, Y. ; RAJOHARISON, A. ; REN, L. ; DOLLET, S. ; RICHARD, N. ; VERNET, G. ; JAVOUHEY, E. ; WANG, J. ; TELLES, J. ; PARANHOS-BACCALÀ, G.: Potential implication of new torque teno mini viruses in parapneumonic empyema in children. In: *The European respiratory journal* 42 (2013), Nr. 2, S. 470–479. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00107212>. – DOI 10.1183/09031936.00107212



- [39] 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. In: *Biochemical and biophysical research communications* 241 (1997), Nr. 1, S. 92–97. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1997.7765>. – DOI 10.1006/bbrc.1997.7765
- [40] OKAMOTO, H.: Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. In: *Hepatology Research* 10 (1998), Nr. 1, S. 1–16. [http://dx.doi.org/10.1016/S1386-6346\(97\)00123-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1386-6346(97)00123-X). – DOI 10.1016/S1386-6346(97)00123-X
- [41] MUSHAHWAR, I. K. ; ERKER, J. C. ; MUEHROFF, A. S. ; LEARY, T. P. ; SIMONS, J. N. ; BIRKENMEYER, L. G. ; CHALMERS, M. L. ; PILOT-MATIAS, T. J. ; DEXAI, S. M.: Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (1999), Nr. 6, S. 3177–3182. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.6.3177>. – DOI 10.1073/pnas.96.6.3177
- [42] BANDO, M. ; OHNO, S. ; OSHIKAWA, K. ; TAKAHASHI, M. ; OKAMOTO, H. ; SUGIYAMA, Y.: Infection of TT virus in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. In: *Respiratory medicine* 95 (2001), Nr. 12, S. 935–942. <http://dx.doi.org/10.1053/rmed.2001.1151>. – DOI 10.1053/rmed.2001.1151. – ISSN 0954–6111
- [43] MAGGI, F. ; PIFFERI, M. ; FORNAI, C. ; ANDREOLI, E. ; TEMPESTINI, E. ; VATTERONI, M. ; PRESCIUTTINI, S. ; MARCHI, S. ; PIETROBELLI, A. ; BONER, A. ; PISTELLO, M. ; BENDINELLI, M.: TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. In: *Journal of virology* 77 (2003), Nr. 4, S. 2418–2425. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.77.4.2418-2425.2003>. – DOI 10.1128/jvi.77.4.2418–2425.2003
- [44] VILLIERS, E. de ; SCHMIDT, R. ; DELIUS, H. ; ZUR HAUSEN, H.: Heterogeneity of TT virus related sequences isolated from human tumour biopsy specimens. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 80 (2002), Nr. 1, S. 44–50. <http://dx.doi.org/10.1007/s001090100281>. – DOI 10.1007/s001090100281
- [45] CHU, Charles C. ; ZHANG, Lu ; DHAYALAN, Arjun ; AGAGNINA, Briana M. ; MAGLI, Amanda R. ; FRAHER, Gia ; DIDIER, Sebastien ; JOHNSON, Linda P. ; KENNEDY, William J. ; DAMLE, Rajendra N. ; YAN, Xiao-Jie ; PATTEN, Piers E. M. ; TEICHBERG, Saul ; KODURU, Prasad ; KOLITZ, Jonathan E. ; ALLEN, Steven L. ; RAI, Kanti R. ; CHIORAZZI, Nicholas: Torque teno virus 10 isolated by genome amplification techniques from a patient with concomitant chronic lymphocytic leukemia and polycythemia



- vera. In: *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 17 (2011), Nr. 11-12, S. 1338–1348. <http://dx.doi.org/10.2119/molmed.2010.00110>. – DOI 10.2119/molmed.2010.00110
- [46] GARBUGLIA, A. R. ; IEZZI, T. ; CAPOBIANCHI, M. R. ; PIGNOLONI, P. ; PULSONI, A. ; SOURDIS, J. ; PESCARMONA, E. ; VITOLO, D. ; MANDELLI, F.: Detection of TT virus in lymph node biopsies of B-cell lymphoma and Hodgkin's disease, and its association with EBV infection. In: *International journal of immunopathology and pharmacology* 16 (2003), Nr. 2, S. 109–118. <http://dx.doi.org/10.1177/039463200301600204>. – DOI 10.1177/039463200301600204. – ISSN 0394–6320
- [47] KIKUCHI, K. ; MIYAKAWA, H. ; ABE, K. ; KAKO, M. ; KATAYAMA, K. ; FUKUSHI, S. ; MISHIRO, S.: Indirect evidence of TTV replication in bone marrow cells, but not in hepatocytes, of a subacute hepatitis/aplastic anemia patient. In: *Journal of medical virology* 61 (2000), Nr. 1, S. 165–170. – ISSN 0146–6615
- [48] MIYAMOTO, M. ; TAKAHASHI, H. ; SAKATA, I. ; ADACHI, Y.: Hepatitis-associated aplastic anemia and transfusion-transmitted virus infection. In: *Internal medicine (Tokyo, Japan)* 39 (2000), Nr. 12, S. 1068–1070. <http://dx.doi.org/10.2169/internalmedicine.39.1068>. – DOI 10.2169/internalmedicine.39.1068
- [49] COSTA, M. ; COSTA, Izaias P. ; DEVALLE, S. ; CASTRO, A. ; FREITAS, S. Z.: Prevalence and genetic diversity of torque teno virus in patients with systemic lupus erythematosus in a reference service in Mato Grosso do Sul. In: *Revista brasileira de reumatologia* 52 (2012), Nr. 1, S. 49–54
- [50] GERGELY, Peter ; PULLMANN, Rudolf ; STANCATO, Christina ; OTVOS, Laszlo ; KONCZ, Agnes ; BLAZSEK, Antal ; POOR, Gyula ; BROWN, Kevin E. ; PHILLIPS, Paul E. ; PERL, Andras: Increased prevalence of transfusion-transmitted virus and cross-reactivity with immunodominant epitopes of the HRES-1/p28 endogenous retroviral autoantigen in patients with systemic lupus erythematosus. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 116 (2005), Nr. 2, S. 124–134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2005.04.002>. – DOI 10.1016/j.clim.2005.04.002. – ISSN 1521–6616
- [51] GERGELY, Peter ; BLAZSEK, Antal ; DANKÓ, Katalin ; PONYI, Andrea ; POÓR, Gyula: Detection of TT virus in patients with idiopathic inflammatory myopathies. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1050 (2005), S. 304–313. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1313.032>. – DOI 10.1196/annals.1313.032. – ISSN 0077–8923
- [52] SOSPEDRA, M. ; ZHAO, Y. ; ZUR HAUSEN, H. ; MURARO, P. ; HAMASHIN, C. ; DE VILLIERS, E. ; PINILLA, C. ; MARTIN, R.: Recognition of conserved amino acid motifs of common viruses and its role in autoimmunity. In: *PLoS pathogens* 1 (2005), Nr. 4, S. e41. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0010041>. – DOI 10.1371/journal.ppat.0010041

- [53] BENDINELLI, M. ; PISTELLO, M. ; MAGGI, F. ; FORNAI, C. ; FREER, G. ; VATTERONI, M. L.: Molecular properties, biology, and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. In: *Clinical microbiology reviews* 14 (2001), Nr. 1, S. 98–113. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.14.1.98-113.2001>. – DOI 10.1128/CMR.14.1.98–113.2001. – ISSN 0893–8512
- [54] SIMMONDS, P. ; PRESCOTT, L. E. ; LOGUE, C. ; DAVIDSON, F. ; THOMAS, A. ; LUDLAM, C.: TT virus–part of the normal human flora? In: *The Journal of infectious diseases* 180 (1999), Nr. 5, S. 1748–1750. <http://dx.doi.org/10.1086/315103>. – DOI 10.1086/315103
- [55] BENDINELLI, M. ; MAGGI, F.: TT Virus and Other Anelloviruses. Version: 2010. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470688618.taw0263>. In: MAHY, Brian W. (Hrsg.) ; MEULEN, Volker t. (Hrsg.) ; BORRIELLO, S. P. (Hrsg.) ; MURRAY, Patrick R. (Hrsg.) ; FUNKE, Guido (Hrsg.) ; KAUFMANN, Stefan H. (Hrsg.) ; STEWARD, Michael W. (Hrsg.) ; MERZ, William G. (Hrsg.) ; HAY, Roderick J. (Hrsg.) ; COX, F.E.G (Hrsg.) ; WAKELIN, Derek (Hrsg.) ; GILLESPIE, Stephen H. (Hrsg.) ; DESPOMMIER, Dickson D. (Hrsg.): *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections* Bd. 74. Chichester, UK : John Wiley & Sons, Ltd, 2010. – DOI 10.1002/9780470688618.taw0263. – ISBN 9780470686386, S. 1549
- [56] OKAMOTO, H.: History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. In: *Current topics in microbiology and immunology* 331 (2009), S. 1–20. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-70972-5\\_1](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-70972-5_1). – DOI 10.1007/978-3-540-70972-5\_1. – ISSN 0070–217X
- [57] SIMMONDS, P. ; DAVIDSON, F. ; LYCETT, C. ; LE PRESCOTT ; MACDONALD, D. ; ELLENDER, J. ; YAP, P. ; HAYDON, G. ; GILLON, J. ; JARVIS, L. ; LUDLAM, C.: Detection of a novel DNA virus (TT virus) in blood donors and blood products. In: *The Lancet* 352 (1998), Nr. 9123, S. 191–195. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(98\)03056-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(98)03056-6). – DOI 10.1016/s0140–6736(98)03056–6
- [58] IRSHAD, M. ; JOSHI, Y. K. ; SHARMA, Y. ; DHAR, I.: Transfusion transmitted virus: A review on its molecular characteristics and role in medicine. In: *World journal of gastroenterology* 12 (2006), Nr. 32, S. 5122–5134. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v12.i32.5122>. – DOI 10.3748/wjg.v12.i32.5122. – ISSN 1007–9327
- [59] ROSS, R.: Detection of TT virus DNA in specimens other than blood. In: *Journal of Clinical Virology* 13 (1999), Nr. 3, S. 181–184. [http://dx.doi.org/10.1016/s1386-6532\(99\)00015-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1386-6532(99)00015-3). – DOI 10.1016/s1386–6532(99)00015–3. – ISSN 13866532
- [60] ISHIKAWA, T. ; HAMANO, Y. ; OKAMOTO, H.: Frequent detection of TT virus in throat swabs of pediatric patients. In: *Infection* 27 (1999), Nr. 4-5, S. 298. – ISSN 0300–8126
- [61] SCHRÖTER, M. ; POLYWKA, S. ; ZÖLLNER, B. ; SCHÄFER, P. ; LAUFS, R. ; FEUCHT, H. H.: Detection of TT virus DNA and GB virus type C/Hepatitis G virus RNA in serum

- and breast milk: determination of mother-to-child transmission. In: *Journal of clinical microbiology* 38 (2000), Nr. 2, S. 745–747. – ISSN 0095–1137
- [62] INAMI, Tomoko ; KONOMI, Nami ; ARAKAWA, Yasuyuki ; ABE, Kenji: High Prevalence of TT Virus DNA in Human Saliva and Semen. In: *Journal of clinical microbiology* 38 (2000), Nr. 6, S. 2407–2408. – ISSN 0095–1137
- [63] FORNAI, C. ; MAGGI, F. ; VATTERONI, M. L. ; PISTELLO, M. ; BENDINELLI, M.: High prevalence of TT virus (TTV) and TTV-like minivirus in cervical swabs. In: *Journal of clinical microbiology* 39 (2001), Nr. 5, S. 2022–2024. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.5.2022-2024.2001>. – DOI 10.1128/JCM.39.5.2022-2024.2001
- [64] OKAMOTO, H. ; AKAHANE, Y. ; UKITA, M. ; FUKUDA, M. ; TSUDA, F. ; MIYAKAWA, Y. ; MAYUMI, M.: Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. In: *Journal of medical virology* 56 (1998), Nr. 2, S. 128–132. – ISSN 0146–6615
- [65] GERNER, P. ; OETTINGER, R. ; GERNER, W. ; FALBREDE, J. ; WIRTH, S.: Mother-to-infant transmission of TT virus: prevalence, extent and mechanism of vertical transmission. In: *The Pediatric infectious disease journal* 19 (2000), Nr. 11, S. 1074–1077. <http://dx.doi.org/10.1097/00006454-200011000-00009>. – DOI 10.1097/00006454-200011000-00009. – ISSN 0891–3668
- [66] MAGGI, Fabrizio ; BENDINELLI, Mauro: Human anelloviruses and the central nervous system. In: *Reviews in medical virology* 20 (2010), Nr. 6, S. 392–407. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.668>. – DOI 10.1002/rmv.668. – ISSN 1052–9276
- [67] MAGGI, Fabrizio ; ANDREOLI, Elisabetta ; LANINI, Letizia ; FORNAI, Claudia ; VATTERONI, Marialinda ; PISTELLO, Mauro ; PRESCIUTTINI, Silvano ; BENDINELLI, Mauro: Relationships between total plasma load of torquetenovirus (TTV) and TTV genogroups carried. In: *Journal of clinical microbiology* 43 (2005), Nr. 9, S. 4807–4810. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.9.4807-4810.2005>. – DOI 10.1128/JCM.43.9.4807–4810.2005
- [68] PRESCOTT, L. E. ; SIMMONDS, P.: Global distribution of transfusion-transmitted virus. In: *The New England journal of medicine* 339 (1998), Nr. 11, S. 776–777. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199809103391118>. – DOI 10.1056/NEJM199809103391118
- [69] TYAGI, A. ; PRADIER, A. ; BAUMER, O. ; UPPUGUNDURI, C. ; HUEZO-DIAZ, P. ; POSFAY-BARBE, K. ; ROOSNEK, E. ; ANSARI, M.: Validation of SYBR Green based quantification assay for the detection of human Torque Teno virus titers from plasma. In: *Virology journal* 10 (2013), S. 191. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-10-191>. – DOI 10.1186/1743-422X-10-191

- [70] HALOSCHAN, Mats ; BETTESCH, Rainer ; GÖRZER, Irene ; WESESLINDTNER, Lukas ; KUNDI, Michael ; PUCHHAMMER-STÖCKL, Elisabeth: TTV DNA plasma load and its association with age, gender, and HCMV IgG serostatus in healthy adults. In: *Age (Dordrecht, Netherlands)* 36 (2014), Nr. 5, S. 9716. <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-014-9716-2>. – DOI 10.1007/s11357-014-9716-2
- [71] MAGGI, F. ; PISTELLO, M. ; VATTERONI, M. ; PRESCIUTTINI, S. ; MARCHI, S. ; ISOLA, P. ; FORNAI, C. ; FAGNANI, S. ; ANDREOLI, E. ; ANTONELLI, G. ; BENDINELLI, M.: Dynamics of persistent TT virus infection, as determined in patients treated with alpha interferon for concomitant hepatitis C virus infection. In: *Journal of virology* 75 (2001), Nr. 24, S. 11999–12004. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.75.24.11999-12004.2001>. – DOI 10.1128/JVI.75.24.11999-12004.2001
- [72] NOWAK, M. A. ; BONHOEFFER, S. ; HILL, A. M. ; BOEHME, R. ; THOMAS, H. C. ; MCDADE, H.: Viral dynamics in hepatitis B virus infection. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (1996), Nr. 9, S. 4398–4402. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.9.4398>. – DOI 10.1073/pnas.93.9.4398
- [73] PERELSON, A. S. ; NEUMANN, A. U. ; MARKOWITZ, M. ; LEONARD, J. M. ; HO, D. D.: HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. In: *Science (New York, N.Y.)* 271 (1996), Nr. 5255, S. 1582–1586. <http://dx.doi.org/10.1126/science.271.5255.1582>. – DOI 10.1126/science.271.5255.1582
- [74] ROCCHI, Jara ; RICCI, Valentina ; ALBANI, Melania ; LANINI, Letizia ; ANDREOLI, Elisabetta ; MACERA, Lisa ; PISTELLO, Mauro ; CECCHERINI-NELLI, Luca ; BENDINELLI, Mauro ; MAGGI, Fabrizio: Torquetenovirus DNA drives proinflammatory cytokines production and secretion by immune cells via toll-like receptor 9. In: *Virology* 394 (2009), Nr. 2, S. 235–242. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2009.08.036>. – DOI 10.1016/j.virol.2009.08.036
- [75] ZHENG, H. ; YE, L. ; FANG, X. ; LI, B. ; WANG, Y. ; XIANG, X. ; KONG, L. ; WANG, W. ; ZENG, Y. ; YE, L. ; WU, Z. ; SHE, Y. ; ZHOU, X.: Torque teno virus (SANBAN isolate) ORF2 protein suppresses NF-kappaB pathways via interaction with IkappaB kinases. In: *Journal of virology* 81 (2007), Nr. 21, S. 11917–11924. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01101-07>. – DOI 10.1128/JVI.01101-07
- [76] KINCAID, Rodney P. ; BURKE, James M. ; COX, Jennifer C. ; VILLIERS, Ethel-Michele de ; SULLIVAN, Christopher S.: A human torque teno virus encodes a microRNA that inhibits interferon signaling. In: *PLoS pathogens* 9 (2013), Nr. 12, S. e1003818. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003818>. – DOI 10.1371/journal.ppat.1003818. – ISSN 1553-7366

- [77] CULLEN, Bryan R.: Viruses and microRNAs. In: *Nature genetics* 38 Suppl (2006), S. S25–30. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1793>. – DOI 10.1038/ng1793. – ISSN 1061–4036
- [78] KINCAID, Rodney P. ; SULLIVAN, Christopher S.: Virus-encoded microRNAs: an overview and a look to the future. In: *PLoS pathogens* 8 (2012), Nr. 12, S. e1003018. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003018>. – DOI 10.1371/journal.ppat.1003018. – ISSN 1553–7366
- [79] CULLEN, Bryan R.: MicroRNAs as mediators of viral evasion of the immune system. In: *Nature immunology* 14 (2013), Nr. 3, S. 205–210. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2537>. – DOI 10.1038/ni.2537
- [80] BOSS, Isaac W. ; RENNE, Rolf: Viral miRNAs: tools for immune evasion. In: *Current opinion in microbiology* 13 (2010), Nr. 4, S. 540–545. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2010.05.017>. – DOI 10.1016/j.mib.2010.05.017
- [81] ZHU, Ming-hua ; JOHN, Susan ; BERG, Maria ; LEONARD, Warren J.: Functional Association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFN  $\gamma$ -Mediated Signaling. In: *Cell* 96 (1999), Nr. 1, S. 121–130. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80965-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80965-4). – DOI 10.1016/s0092-8674(00)80965-4
- [82] MAGGI, F. ; PIFFERI, M. ; MICHELUCCI, A. ; ALBANI, M. ; SBRANTI, S. ; LANINI, L. ; SIMI, P. ; MACCHIA, P. ; PISTELLO, M. ; BENDINELLI, M.: Torque teno virus viremia load size in patients with selected congenital defects of innate immunity. In: *Clinical and vaccine immunology : CVI* 18 (2011), Nr. 4, S. 692–694. <http://dx.doi.org/10.1128/ CVI.00466-10>. – DOI 10.1128/ CVI.00466-10
- [83] FOCOSI, D. ; MAGGI, F. ; ALBANI, M. ; MACERA, L. ; RICCI, V. ; GRAGNANI, S. ; DI BEO, S. ; GHIMENTI, M. ; ANTONELLI, G. ; BENDINELLI, M. ; PISTELLO, M. ; CECCHERINELLI, L. ; PETRINI, M.: Torquetenovirus viremia kinetics after autologous stem cell transplantation are predictable and may serve as a surrogate marker of functional immune reconstitution. In: *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 47 (2010), Nr. 2, S. 189–192. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2009.11.027>. – DOI 10.1016/j.jcv.2009.11.027
- [84] MAGGI, F. ; RICCI, V. ; BENDINELLI, M. ; NELLI, L. ; FOCOSI, D. ; PAPINESCHI, F. ; PETRINI, M. ; PAUMGARDHEN, E. ; GHIMENTI, M.: Changes In CD8+57+ T lymphocyte expansions after autologous hematopoietic stem cell transplantation correlate with changes in torquetenovirus viremia. In: *Transplantation* 85 (2008), Nr. 12, S. 1867–1868. <http://dx.doi.org/10.1097/TP.0b013e31817615e6>. – DOI 10.1097/TP.0b013e31817615e6
- [85] WALTON, A. ; MUENZER, J. ; RASCHE, D. ; BOOMER, J. ; SATO, B. ; BROWNSTEIN, B. ; PACHOT, A. ; BROOKS, T. ; DEYCH, E. ; SHANNON, W. ; GREEN, J. ; STORCH, G. ;

- HOTCHKISS, R.: Reactivation of multiple viruses in patients with sepsis. In: *PloS one* 9 (2014), Nr. 2, S. e98819. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0098819>. – DOI 10.1371/journal.pone.0098819
- [86] THOM, K. ; PETRIK, J.: Progression towards AIDS leads to increased Torque teno virus and Torque teno minivirus titers in tissues of HIV infected individuals. In: *Journal of medical virology* 79 (2007), Nr. 1, S. 1–7. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.20756>. – DOI 10.1002/jmv.20756
- [87] FOGLI, M. ; TORTI, C. ; MALACARNE, F. ; FIORENTINI, S. ; ALBANI, M. ; IZZO, I. ; GIAGULLI, C. ; MAGGI, F. ; CAROSI, G. ; CARUSO, A.: Emergence of exhausted B cells in asymptomatic HIV-1-infected patients naïve for HAART is related to reduced immune surveillance. In: *Clinical & developmental immunology* 2012 (2012), S. 829584. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/829584>. – DOI 10.1155/2012/829584
- [88] LI, Linlin ; DENG, Xutao ; DA COSTA, Antonio C. ; BRUHN, Roberta ; DEEKS, Steven G. ; DELWART, Eric: Virome analysis of antiretroviral-treated HIV patients shows no correlation between T-cell activation and anelloviruses levels. In: *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 72 (2015), S. 106–113. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2015.09.004>. – DOI 10.1016/j.jcv.2015.09.004
- [89] ZHONG, S. ; YEO, W. ; TANG, M. W. ; LIN, X. R. ; MO, F. ; HO, W. M. ; HUI, P. ; JOHNSON, P. J.: Gross elevation of TT virus genome load in the peripheral blood mononuclear cells of cancer patients. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 945 (2001), S. 84–92. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03868.x>. – DOI 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03868.x
- [90] MASOURIDI-LEVRAT, S. ; PRADIER, A. ; SIMONETTA, F. ; KAISER, L. ; CHALANDON, Y. ; ROOSNEK, E.: Torque teno virus in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies. In: *Bone marrow transplantation* 51 (2016), Nr. 3, S. 440–442. <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2015.262>. – DOI 10.1038/bmt.2015.262
- [91] KANDA, Y. ; TANAKA, Y. ; KAMI, M. ; SAITO, T. ; ASAI, T. ; IZUTSU, K. ; YUJI, K. ; OGAWA, S. ; HONDA, H. ; MITANI, K. ; CHIBA, S. ; YAZAKI, Y. ; HIRAI, H.: TT virus in bone marrow transplant recipients. In: *Blood* 93 (1999), Nr. 8, S. 2485–2490. – ISSN 0006–4971
- [92] GÖRZER, Irene ; JAKSCH, Peter ; KUNDI, Michael ; SEITZ, Tamara ; KLEPETKO, Walter ; PUCHHAMMER-STÖCKL, Elisabeth: Pre-transplant plasma Torque Teno virus load and increase dynamics after lung transplantation. In: *PloS one* 10 (2015), Nr. 3, S.



e0122975. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0122975>. – DOI 10.1371/journal.pone.0122975

- [93] BÉLAND, K. ; DORE-NGUYEN, M. ; GAGNÉ, M. ; PATEY, N. ; BRASSARD, J. ; ALVAREZ, F. ; HALAC, U.: Torque Teno virus in children who underwent orthotopic liver transplantation: new insights about a common pathogen. In: *The Journal of infectious diseases* 209 (2014), Nr. 2, S. 247–254. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jit423>. – DOI 10.1093/infdis/jit423. – ISSN 0022–1899
- [94] FOCOSI, D. ; MACERA, L. ; PISTELLO, M. ; MAGGI, F.: Torque Teno virus viremia correlates with intensity of maintenance immunosuppression in adult orthotopic liver transplant. In: *The Journal of infectious diseases* 210 (2014), Nr. 4, S. 667–668. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiu209>. – DOI 10.1093/infdis/jiu209
- [95] GÖRZER, Irene ; HALOSCHAN, Mats ; JAKSCH, Peter ; KLEPETKO, Walter ; PUCHHAMMER-STÖCKL, Elisabeth: Plasma DNA levels of Torque teno virus and immunosuppression after lung transplantation. In: *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 33 (2014), Nr. 3, S. 320–323. <http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2013.12.007>. – DOI 10.1016/j.healun.2013.12.007
- [96] SCHIEMANN, M. ; PUCHHAMMER-STÖCKL, E. ; ESKANDARY, F. ; KOHLBECK, P. ; RASOUL-ROCKENSCHAUB, S. ; HEILOS, A. ; KOZAKOWSKI, N. ; GÖRZER, I. ; KIKIĆ, Ž. ; HERKNER, H. ; BÖHMIG, G. ; BOND, G.: Torque Teno Virus Load-Inverse Association With Antibody-Mediated Rejection After Kidney Transplantation. In: *Transplantation* 101 (2017), Nr. 2, S. 360–367. <http://dx.doi.org/10.1097/TP.0000000000001455>. – DOI 10.1097/TP.0000000000001455
- [97] SIMONETTA, F. ; PRADIER, A. ; MASOURIDI-LEVRAT, S. ; VAN DELDEN, C. ; GIOSTRA, E. ; MORARD, I. ; MUELLER, N. ; MUELLHAUPT, B. ; VALLI, P. ; SEMMO, N. ; SEEBACH, J. ; CHALANDON, Y. ; KAISER, L. ; ROOSNEK, E.: Torque Teno Virus Load and Acute Rejection After Orthotopic Liver Transplantation. In: *Transplantation* 101 (2017), Nr. 7, S. e219–e221. <http://dx.doi.org/10.1097/TP.0000000000001723>. – DOI 10.1097/TP.0000000000001723
- [98] FOCOSI, D. ; BESTAGNO, M. ; BURRONE, O. ; PETRINI, M.: CD57+ T lymphocytes and functional immune deficiency. In: *Journal of leukocyte biology* 87 (2010), Nr. 1, S. 107–116. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0809566>. – DOI 10.1189/jlb.0809566
- [99] WOHLFARTH, P. ; LEINER, M. ; SCHOERGENHOFER, C. ; HOPFINGER, G. ; GOERZER, I. ; PUCHHAMMER-STOECKL, E. ; RABITSCH, W.: Torquetenovirus Dynamics and Immune Marker Properties in Patients Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Trans-

- plantation: A Prospective Longitudinal Study. In: *Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 24 (2018), Nr. 1, S. 194–199. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2017.09.020>. – DOI 10.1016/j.bbmt.2017.09.020
- [100] ALBERT, E. ; SOLANO, C. ; PASCUAL, T. ; TORRES, I. ; MACERA, L. ; FOCOSI, D. ; MAGGI, F. ; GIMÉNEZ, E. ; AMAT, P. ; NAVARRO, D.: Dynamics of Torque Teno virus plasma DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. In: *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 94 (2017), S. 22–28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2017.07.001>. – DOI 10.1016/j.jcv.2017.07.001
- [101] ALBERT, E. ; SOLANO, C. ; GIMÉNEZ, E. ; FOCOSI, D. ; PÉREZ, A. ; MACERA, L. ; PIÑANA, J. L. ; BOLUDA, J. C. H. ; MAGGI, F. ; NAVARRO, D.: The kinetics of torque teno virus plasma DNA load shortly after engraftment predicts the risk of high-level CMV DNAemia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. In: *Bone marrow transplantation* 53 (2018), Nr. 2, S. 180–187. <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2017.235>. – DOI 10.1038/bmt.2017.235
- [102] RUUTU, T. ; GRATWOHL, A. ; WITTE, T. de ; AFANASYEV, B. ; APPERLEY, J. ; BACIGALUPO, A. ; DAZZI, F. ; DREGER, P. ; DUARTE, R. ; FINKE, J. ; GARDERET, L. ; GREINIX, H. ; HOLLER, E. ; KRÖGER, N. ; LAWITSCHKA, A. ; MOHTY, M. ; NAGLER, A. ; PASSWEG, J. ; RINGDÉN, O. ; SOCIÉ, G. ; SIERRA, J. ; SUREDA, A. ; WIKTOR-JEDRZEJCZAK, W. ; MADRIGAL, A. ; NIEDERWIESER, D.: Prophylaxis and treatment of GVHD: EBMT-ELN working group recommendations for a standardized practice. In: *Bone marrow transplantation* 49 (2014), Nr. 2, S. 168–173. <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2013.107>. – DOI 10.1038/bmt.2013.107
- [103] MAGGI, F. ; FORNAI, C. ; VATTERONI, M. L. ; SICILIANO, G. ; MENICETTI, F. ; TASCINI, C. ; SPECTER, S. ; PISTELLO, M. ; BENDINELLI, M.: Low prevalence of TT virus in the cerebrospinal fluid of viremic patients with central nervous system disorders. In: *Journal of medical virology* 65 (2001), Nr. 2, S. 418–422. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.2051>. – DOI 10.1002/jmv.2051. – ISSN 0146–6615
- [104] PISTELLO, M. ; MORRICA, A. ; MAGGI, F. ; VATTERONI, M. L. ; FREER, G. ; FORNAI, C. ; CASULA, F. ; MARCHI, S. ; CICCOROSSO, P. ; ROVERO, P. ; BENDINELLI, M.: TT virus levels in the plasma of infected individuals with different hepatic and extrahepatic pathology. In: *Journal of medical virology* 63 (2001), Nr. 2, S. 189–195. – ISSN 0146–6615
- [105] BÉLAND, K. ; DORE-NGUYEN, M. ; GAGNÉ, M. ; PATEY, N. ; BRASSARD, J. ; ALVAREZ, F. ; HALAC, U.: Torque Teno virus load as a biomarker of immunosuppression? New



hopes and insights. In: *The Journal of infectious diseases* 210 (2014), Nr. 4, S. 668–670. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiu210>. – DOI 10.1093/infdis/jiu210. – ISSN 0022–1899

- [106] GILLES, R. ; HERLING, M. ; HOLTICK, U. ; HEGER, E. ; AWERKIEW, S. ; FISH, I. ; HÖLLER, K. ; SIERRA, S. ; KNOPS, E. ; KAISER, R. ; SCHEID, C. ; DI CRISTANZIANO, V.: Dynamics of Torque Teno virus viremia could predict risk of complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. In: *Medical microbiology and immunology* 206 (2017), Nr. 5, S. 355–362. <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-017-0511-4>. – DOI 10.1007/s00430-017-0511-4
- [107] KANDA, Y. ; HIRAI, H.: TT virus in hematological disorders and bone marrow transplant recipients. In: *Leukemia & lymphoma* 40 (2001), Nr. 5-6, S. 483–489. <http://dx.doi.org/10.3109/10428190109097647>. – DOI 10.3109/10428190109097647. – ISSN 1042–8194

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die mich auf dem Weg zu meiner Promotion begleitet, unterstützt, mich fachlich, mental, inhaltlich und technisch beraten und mir wertvolle Tipps und Hinweise gegeben haben.

Allen voran danke ich von Herzen meinen Eltern, meiner Schwester, meinem Doktorvater, meinem Co-Betreuer, den Mitarbeitern im Labor sowie meinen Freunden für Rat und Tat – Sie und Ihr habt die Arbeit erst möglich gemacht und dafür bin ich allen unendlich dankbar.