

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und
Poliklinik (Department) Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
(Schwerpunkt: Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie,
Rheumatologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz**

**Nachweis von Punktmutationen im TNF- α - und IFN- γ -
Promotor bei Patienten nach allogener
Stammzelltransplantation oder
Knochenmarktransplantation**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Eleni Paschalinou
aus Turkey/Türkei**

2008

Dekan : Professor Dr. I.B. Autenrieth
1.Berichtserstatter : Professor Dr. H. Einsele
2.Berichtserstatter : Professor Dr. C. Sinzger

gewidmet meinen Eltern
und meiner Schwester Sofia

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	8
1 Einleitung	10
1.1 Zytokine	10
1.2 Tumor-Nekrose-Faktor-alpha	10
1.2.1 Biologische Wirkungen von TNF- α	11
1.2.2 Interaktion zwischen TNF- α und INF- γ	13
1.3 Interferon-gamma	13
1.3.1 Biologische Wirkungen von INF- γ	14
1.4 Basenveränderungen in Promotor-Regionen	15
1.5 Infektionen nach Stammzelltransplantation	15
1.5.1 CMV-Epidemiologie, -Übertragung, -Pathogenese	16
1.5.2 CMV-Immunität, -Klinik	17
1.5.3 CMV-Diagnostik	19
1.5.4 CMV-Prophylaxe, -Therapie	20
1.6 Stammzelltransplantation und Graft-versus-Horst-Disease	22
1.7 Zielsetzung der Arbeit	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Materialien	26
2.1.1 Geräte und Verbrauchsgegenstände	26
2.1.2 Enzyme, Nukleotide, Primer, Chemikalien	26
2.2 Methoden	28
2.2.1 TNF- α und IFN- γ	28
2.2.1.1 DNA-Extraktion aus EDTA-Blut	28
2.2.1.2 Amplifikation der Human-DNA mittels PCR	28
2.2.1.3 Gel-Elektrophorese	30
2.2.1.4 Aufreinigung der PCR-Produkte	31
2.2.1.5 Sequenzierungs-PCR	32
2.2.1.6 Aufreinigung der Sequenzierungs-PCR-Produkte.....	32

2.2.1.7 Sequenzierung	32
2.2.2 TNF- α und IFN- γ	33
2.2.2.1 Amplifikation der Human-DNA mittels PCR	33
2.2.2.2 Aufreinigung der PCR-Produkte	34
2.2.2.3 Gel-Elektrophorese nach der Aufreinigung der PCR-Produkte	34
2.2.2.4 Sequenzierungs-PCR	35
2.2.2.5 Aufreinigung der Sequenzierungs-PCR-Produkte	35
2.2.2.6 Sequenzierung	35
3 Ergebnisse	36
3.1 CMV-Ergebnisse	38
3.1.1 TNF- α -Promotor-Region	38
3.1.1.1 TNF- α -Promotor-Region bei Patienten ohne CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach allogener Stammzelltransplantation	38
3.1.1.2 Zusammenfassung	42
3.1.1.3 TNF- α -Promotor-Region bei Patienten mit CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach allogener Stammzelltransplantation	47
3.1.1.4 Zusammenfassung	43
3.1.1.5 Darstellung der Ergebnisse	47
3.1.2 INF- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen -1064 und -685	59
3.1.2.1 INF- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen -1064 und -685 bei Patienten ohne aufgetretene CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT	59
3.1.2.2 INF- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen -1064 und -685 bei Patienten mit aufgetretener CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT	60
3.1.2.3 INF- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen -1064 und -685 bei CMV-seronegativen und -seropositiven	

Patienten vor der SCT	61
3.1.3 INF- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen -704 und -375	61
3.1.3.1 INF- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen -704 und -375 bei Patienten ohne aufgetretene CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT	61
3.1.3.2 INF- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen -704 und -375 bei Patienten mit aufgetretener CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT	62
3.1.3.3 INF- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen -704 und -375 bei CMV-seronegativen und –seropositiven Patienten vor SCT	62
3.1.4 INF- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen -394 und +35	62
3.1.4.1 INF- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen -394 und +35 bei Patienten ohne aufgetretene CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT	62
3.1.4.2 INF- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen -394 und +35 bei Patienten mit aufgetretener CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT	63
3.1.4.3 INF- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen -394 und +35 bei CMV-seronegativen und –seropositiven Patienten vor SCT	63
3.2 Akute GvHD	64
3.2.1 Schweregrade und Stadieneinteilung	64
3.2.2 TNF- α -Promotor-Region	66
3.2.2.1 Patientendaten	66
3.2.2.2 Darstellung der Ergebnisse	79
3.2.3 INF- γ -Promotor-Region	85
3.2.3.1 INF- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen -1064 und -685	85

3.2.3.2	INF- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen -704 und -375	88
3.2.3.3	INF- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen -394 und +35	88
3.3	chronische GvHD	89
3.3.1	TNF- α -Promotor-Region	89
3.3.2	INF- γ -Promotor-Region	91
4	Diskussion	93
4.1	Polymorphismus im Genom	93
4.2	Punktmutationen im Genom	94
4.3	Mutationen in Promotoren	95
4.4	TNF- α und INF- γ	96
4.4.1	TNF- α	96
4.4.1.1	Polymorphismus im TNF- α -Promotor	96
4.4.1.2	Antivirale Eigenschaften vom TNF- α	98
4.4.1.3	CMV-Infektion	100
4.4.1.4	Transplantationskomplikationen	103
4.4.1.5	Immunpathologisch relevante Eigenschaften von TNF- α	103
4.4.1.6	Transplantationsabstoßung	104
4.4.1.7	GvHD	107
4.4.2	INF- γ	112
4.4.2.1	CMV-Infektion	112
4.4.2.2	akute GvHD	112
4.4.2.3	chronische GvHD	113
4.5	Zusammenfassung	114
5	Literaturverzeichnis	116
	Danksagung	131
	Lebenslauf	132

Abkürzungen

ATG	antithymocyte globulin
BAL	bronchioalveoläre Lavage
CD	cluster of differentiation
CMV	Cytomegalie-Virus
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
CSA	Ciclosporin A
d ATP	Desoxyadenosintriphosphat
d CTP	Desoxycytosintriphosphat
d GTP	Desoxyguanosintriphosphat
d NTP	Desoxynucleotidtriphosphat
d TTP	Desoxythymidintriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EBV	Epstein-Barr-virus
EDTA	Ethyldiaminessigsäure
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
GvHD	Graft-versus-Host-disease
HLA	Humanes Histokompatibilitäts-Antigen
IDDM	insulin-dependent diabetes mellitus
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

KMT	Knochenmarktransplantation
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Major Histocompatibility Complex
NASBA	Nucleid Acid Sequence Based Amplification
NF	Transkriptionsfaktor
NK	natürliche Killerzelle
OKT3	anti T-cell monoclonal antibody OKT3
PCR	Polymerasekettenreaction
PBSCT	Transplantation peripherer Blutstammzellen
RNA	Ribonucleinsäure
SCT	Stammzelltransplantation
SDS	Natriumdodecysulfat
SLE	systemischer Lupus erythematoses
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
Taq-Polymerase	Polymerase aus Thermus aquaticus
T _H	Helfer-T-Zellen, Subpopulation
TNF	Tumor-nekrose-faktor
Tris	Trishydroxymethylethylendiamin
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Zytokine

Zytokine sind hormonähnliche Peptide und Proteine mit Signalfunktion, die von verschiedenen hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Zellen produziert werden. Ihre vielen biologischen Aufgaben können in drei Bereiche eingeteilt werden: sie steuern die Entwicklung und Homöostase des Immunsystems, kontrollieren das hämatopoetische System und beteiligen sich an der unspezifischen Abwehr. Allgemein beeinflussen Zytokine die Genaktivierung und über diesen Weg auch die Aktivierung von Zellen, das Zellwachstum, die Differenzierung, die Expression funktioneller Oberflächenmoleküle und die resultierende zelluläre Effektorfunktion. Sie nehmen auch an der Steuerung der Apoptose teil. Daraus folgt eine weitreichende Wirkung der Zytokine auf die Regulation der Immunantwort und die Pathogenese verschiedener Erkrankungen. Deshalb ist es vor allem bei Immungeschwächten wichtig, dass der Einfluß der Zytokine auf die Immunantwort und ihre Assoziation mit Krankheiten geklärt wird [1a,2a].

Besonders abwehrgeschwächte Patienten sind für Infektionen mit Viren, Bakterien oder Pilzen anfällig. Aus den vielen opportunistischen Keimen spielen die Cytomegalieviren als Krankheitserreger bei stammzelltransplantierten Patienten eine wichtige Rolle [1b].

Eine andere gefürchtete Komplikation nach allogener Stammzelltransplantation ist die Graft-versus-Host-Disease [1c].

Angesichts der Rolle der Zytokine als Mediatorstoffe der Immunantwort ist es wichtig, ihren Einfluß auf den Auftritt und Verlauf der CMV-Infektionen und GvHD zu untersuchen.

1.2 Tumor-Nekrose-Faktor-alpha

Zu den Zytokinen gehört u.a. der Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (syn. Tumor-Nekrose-Faktor). TNF- α ist ein nicht glykolysiertes Protein von 17 KD, das in

vivo als Trimer zu finden ist. Das Gen für TNF- α liegt innerhalb der MHC-Klasse-III-Region auf dem Chromosom Nr. 6 [5a,6,7a,117a]. Die Bezeichnung „Tumor-Nekrose-Faktor“ hat historische Gründe. Der Name basiert auf Beobachtungen, bei denen Injektion von Lipopolysaccharid (Endotoxin) einen löslichen Faktor aus Makrophagen freisetzt, der Tumorzellen zerstören kann [11a]. Die wichtigsten Produzenten von TNF- α sind die LPS-stimulierten mononukleären Phagozyten, obwohl auch andere Zellen, wie antigenstimulierte T-Zellen, aktivierte NK-Zellen, aktivierte Mastzellen und B-Zellen dieses Protein sezernieren können [6,8a,9,11a,117a]. Interferon-gamma erhöht die Tumor-Nekrose-Faktor-alpha-Synthese [9,10a]. TNF- α ist ein Mediator sowohl der natürlichen als auch der erworbenen Immunität. Die Wirkung von TNF- α entsteht durch die Bindung des löslichen Trimers auf seine Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Zwei verschiedene Rezeptoren von 55 und 75 KD sind vorhanden. Die Affinität von TNF- α für seine Rezeptoren ist ungewöhnlich niedrig, aber er wird in sehr großen Mengen produziert und kann daher seine Rezeptoren problemlos sättigen. Es gibt TNF- α -Rezeptoren auf fast allen Zelltypen, die untersucht wurden. Aktivierte Zellen scheiden TNF- α -Rezeptoren aus; solche lösliche Rezeptoren sind in der Lage, die Rezeptoren auf der Zelloberfläche kompetitiv zu hemmen [8a].

1.2.1 Biologische Wirkungen von TNF- α

Bei niedrigen Konzentrationen wirkt TNF- α lokal parakrin und autokrin auf die Leukozyten und Endothelzellen. Die wichtigsten biologischen Wirkungen sind dann:

-TNF- α führt dazu, dass die Endothelzellen neue Oberflächenrezeptoren exprimieren, die die Adhäsion mit Leukozyten erlauben. Durch diese Wirkung kommt es also zur Chemotaxis von Leukozyten am Entzündungsherd, was wahrscheinlich die physiologisch bedeutsamste Wirkung von TNF- α ist [8a,11a,12a,117a].

-Durch den TNF- α werden die Leukozyten der Entzündung aktiviert, so dass sie

Mikroorganismen effektiver eliminieren können. TNF- α ist in der Lage besonders gut Neutrophile zu aktivieren, beeinflusst aber auch die Eosinophilen und mononukleären Phagozyten [8a].

-TNF- α führt zur Stimulation der monokleären Phagozyten und anderen Zellen, damit diese Zytokine (wie IL-1, IL-6 und TNF- α selbst) und Chemokine produzieren [8a].

-Schließlich steigert TNF- α die Expression der Klasse I MHC-Moleküle [8,12a], wodurch es zur Verstärkung der CTL-vermittelten Lyse der mit Viren infizierten Zellen kommt [8a,117a].

Wird die TNF- α -Produktion genügend stark stimuliert, werden größere Mengen des Zytokins produziert. TNF- α gelangt dann in die Zirkulation und kann weit entfernt von den sezernierenden Zellen seine Effekte auslösen. Die wichtigsten systemischen Wirkungen von TNF- α sind:

-TNF- α ist ein endogenes Pyrogen [5,8,11a]. Das stimuliert die Synthese von Prostaglandinen in den Hypothalamuszellen des Gehirns und erzeugt Fieber [8a,12a,13,117a].

-Durch die Wirkung von TNF- α auf mononukleäre Phagozyten und wahrscheinlich auf die vaskulären Endothelzellen werden diese dazu gebracht, IL-1 und IL-6 in den Blutstrom abzugeben, was ein typisches Beispiel für eine Zytokinkaskade ist [8a].

-TNF- α führt zur Erhöhung der Synthese von manchen Serumproteinen und trägt dadurch zu der Akutphasen-Antwort bei [8a,12a,117a].

-TNF- α kann das Gerinnungssystem aktivieren [8a,117a].

-Die Zellteilung der Stammzellen des Knochenmarks kann vom TNF- α unterdrückt werden. Durch eine langandauernde Verabreichung vom TNF- α kann es zur Lymphopenie und Immunmangel kommen [8a].

-Eine chronische systemische Verabreichung vom TNF- α kann eine Kachexie als Folge haben [8a,10a,11a,12a,13a].

Wenn extrem hohe Konzentrationen vom TNF- α produziert werden, wie es im Falle einer Sepsis vorkommt, können mehrere Wirkmechanismen vom TNF- α einen letalen Ausgang haben:

-Die Gewebeperfusion wird vom TNF- α durch Suppression der Myokard-

Kontraktibilität vermindert [8a].

-Außerdem erniedrigt TNF- α den Blutdruck und die Gewebepfusion, indem er die glatte Muskulatur entspannt [8a].

-TNF- α führt zur intravaskulären Thrombusbildung, was wiederum die Gewebepfusion reduziert [8a,14].

-Schwere metabolische Störungen werden vom TNF- α verursacht, wie ein mit dem Leben nicht mehr vereinbarer Abfall der Glucosekonzentration [8a].

1.2.2 Interaktion zwischen TNF- α und INF- γ

Viele der TNF- α -Effekte werden von INF- γ potenziert [8a,10a]. Bei den Zielzellen von TNF- α kann diese Wechselwirkung dadurch erläutert werden, dass durch INF- γ die Anzahl der TNF- α -Rezeptoren erhöht wird. Manchmal erhöht sich aber die TNF- α -Aktivität durch INF- γ , ohne dass ein Einfluss auf die TNF- α -Bindung festgestellt werden kann. Der wirkliche Mechanismus dieser Interaktion ist noch nicht klar, aber aktivierte T-Zellen führen oft zur gleichzeitigen Ausscheidung von TNF- α und INF- γ . Durch diese synergistische Wirkung von den zwei Zytokinen kann es zur Verstärkung der TNF- α -Effekte kommen, ohne dass Konzentrationen benötigt werden, die zu einer systemischen Toxizität führen [8a].

1.3 Interferon-gamma

Interferon-gamma (syn. Typ-II oder Immun-Interferon) ist ein aus 21 bis 24 KD schweren Untereinheiten bestehendes homodimeres Glykoprotein. Dem Größenunterschied liegt eine unterschiedlich starke Glykolysierung zugrunde, aber jede Untereinheit enthält ein identisches Polypeptid aus 18 KD, das von einem Gen kodiert wird [8b]. Der Genort für INF- γ liegt auf dem Chromosom Nr. 12 [6,10b,117b]. Produzenten von INF- γ sind naive (T_H0) und T_H1 $CD4^+$ Helfer-T-Zellen und fast alle $CD8^+$ T-Zellen. Die Transkription fängt direkt als Folge der

Antigenaktivierung an und wird durch IL-2 und IL-12 verstärkt. IFN- γ wird auch durch NK-Zellen produziert [6,12,8b,114].

1.3.1 Biologische Wirkungen von INF- γ

Interferon-gamma hat bei der Immunregulation viele Aktivitäten:

-So hat IFN- γ einen schützenden Effekt gegen Viren [8b,10b,12b]

-und ist außerdem antiproliferativ [8b,10b].

-IFN- γ aktiviert die mononukleären Phagozyten. Es führt zur Induktion der Synthese eines Enzyms, das die Makrophagen dazu bringt, phagozytierte Mikroben abzutöten. Mit der Hilfe von einem zweiten Signal (LPS und eventuell auch TNF- α) verleiht es sogar den Makrophagen die Fähigkeit Krebszellen zu eliminieren. IFN- γ ist der bedeutendste Makrophagen-aktivierende-Faktor und stellt die wichtigste Weise dar, wie T-Zellen die Makrophagen aktivieren [8b,114,117b].

-IFN- γ verstärkt die Expression von Klasse-I und -II MHC-Molekülen in den meisten Zellen [12,8b,10b,11b,114,117b,124]. Dadurch beschleunigt IFN- γ die Erkennungsphase der Immunantwort.

-IFN- γ hat eine direkt Wirkung auf T- und B-Lymphozyten und beeinflusst ihre Differenzierung. IFN- γ treibt die Differenzierung der naiven CD4⁺ T-Zellen in Richtung des T_H1-Subsets voran und behindert das Wachstum der T_H2-Zellen. An der Reifung der CD8⁺ CTL ist auch IFN- γ beteiligt. In B-Zellen wird bei der Maus der Isotyp-Wechsel zum IgG2a unterstützt, der zum IgE gehemmt [8b,114,117b,124].

-Außerdem aktiviert IFN- γ , wenn auch schwächer als TNF- α , die Neutrophilen [8b,10b].

-Die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen wird von IFN- γ gefördert [6,8b,10b,11b,114,124].

-IFN- γ stimuliert die vaskulären Endothelzellen [8b], induziert die Adhäsion der CD4⁺ T-Lymphozyten [12,8b] und fördert morphologische Veränderungen, durch die die Lymphozyten extravaskulär gelangen können.

Im Allgemeinen stimuliert IFN- γ T_H1- und Makrophagen-reiche Entzündungsreaktionen und hemmt dagegen die Reaktionen von T_H2 und Eosinophilen [8b].

1.4 Basenveränderungen in Promotor-Regionen

Sowohl in der Promotor-Region von TNF- α als auch in der von IFN- γ sind Polymorphismus-Stellen bekannt [19,20,21,116,117a]. Die Promotoren sind DNA-Sequenzen, die als Erkennungs- bzw. Bindungsregionen für die DNA-abhängigen-RNA-Polymerasen dienen und deshalb essentiell für die Initiation der Transkription sind. An Kontrollelementen der Promotor-Regionen binden sich Transkriptionsfaktoren, die die Transkription beeinflussen können [2b]. Die Veränderung einer einzigen Base innerhalb der Promotor-Region könnte die Promotoraktivität ändern und dadurch die Transkription entweder verstärken oder abschwächen. Darum ist es wichtig nach Polymorphismen oder Punktmutationen in den Promotoren von TNF- α und IFN- γ und einem eventuellen Zusammenhang mit Infektionen oder Erkrankungen zu suchen.

1.5 Infektionen nach Stammzelltransplantation

Bei Patienten nach allogener KMT oder PBSCT lässt sich das infektiologische Profil in drei Phasen unterteilen:

In der Frühphase sind die vorkommenden Infektionen vornehmlich mit der vorliegenden Granulozytopenie assoziiert [1d].

In der nächsten Phase, d.h. in den ersten Monaten kommen vermehrt atypische Infektionserreger wie Protozoen (*Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii*), Pilze (*Candida* spp., *Aspergillus* spp.) und Zytomegalieviren vor [34]. Die CMV-Infektion beginnt selten früher als 14 Tage nach Transplantation. In Fällen, in denen beim Spendermark die T-Zellen vermindert wurden, kann die Manifestation der Erkrankung beschleunigt werden [1d]. Klinisch muss

zwischen der CMV-Infektion und der CMV-Erkrankung eines oder mehrerer Organe unterschieden werden. Eine CMV-Infektion ist definiert als die Isolation vom CMV oder die Detektion von viralen Proteinen oder Nukleinsäure in Körperflüssigkeiten und Gewebeproben. Von den CMV-Erkrankungen ist die CMV-Pneumonie die gefürchtetste Komplikation nach SCT. Eine CMV-Pneumonie besteht, wenn Symptome auftreten und die Detektion vom CMV in BAL oder Lungengewebeproben erfolgt [23].

In der Spätphase bei Patienten mit chronischer Graft-versus-Host-disease und persistierender Neutropenie sind vor allem Varizella-Zoster-Viren und kapselbildende Bakterien (z. B. *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, Neisserien) zu befürchten [34].

1.5.1 CMV-Epidemiologie, -Übertragung, -Pathogenese

CMV gehört zur Subfamilie der β -Herpes-Viren. Es ist ein behülltes, ikosaedrisches doppelsträngiges DNA-Virus. Seine DNA umfaßt 235 Kbp. Das CMV wird durch einen langsamen Replikationszyklus charakterisiert. Die Synthese seiner Proteine ist durch eine Drei-Stufe-Sequenz geprägt, die vom Genom abgelesen wird [13b]. Die erste nach stattgefundenener CMV-Infektion vorkommende Proteinhauptgruppe wird aus den „immediate early“-Genen gebildet [25]. Die zweite Hauptgruppe wird etwa innerhalb sechs Stunden nach Infektion durch die „early“-Gene kodiert. Die „late“-Proteine entstehen ungefähr fünfzehn Stunden nach erfolgter Infektion [26]. Menschen- und tierpathogene Zytomegalieviren sind weltweit verbreitet und sehr wirtsspezifisch. Das humane CMV wird von Mensch zu Mensch übertragen und kann nur für den Menschen pathogen sein [27].

Die Ansteckung hat bis zum 35. Lebensjahr etwa 50-80% der Gesamtpopulation erfasst. In Deutschland liegt der Anteil der infizierten Menschen zwischen 40% und 70% [13b]. Dieser Anteil ist in vielen Entwicklungsländern höher. Das Leben in Gemeinschaften und eine schlechte persönliche Hygiene haben als Konsequenz eine frühe Ausbreitung [3].

Das CMV wird in zahlreichen Körperflüssigkeiten (Urin, Speichel, Samen, Vaginalsekret, Muttermilch, Tränenflüssigkeit) ausgeschieden und bei Immungeschwächten ist es auch im Stuhl zu finden. Die Übertragung erfolgt vorwiegend durch engen Körperkontakt als Schmierinfektion und beim Stillen oder durch Tröpfcheninfektionen. Das Virus kann auch iatrogen oder als nosokomiale Infektion übertragen werden. Außerdem kann eine Infektion durch Bluttransfusionen oder Transplantationen verursacht werden [13b].

Einmal infiziert, trägt man wahrscheinlich lebenslang das Virus. Meistens bleiben diese Infektionen latent. CMV-Reaktivierungen treten jedoch häufig auf, wenn die T-lymphozytenmedierte Immunität abgeschwächt wird [1b].

Die primäre Virusreplikation findet vermutlich im Oropharynx statt. Im Kern der infizierten Zellen sind die „eulenaugenartigen“ Einschlusskörperchen charakteristisch. Außerdem stellt man eine typische Zellvergrößerung („Cytomegalo“) fest. Gebunden an T-Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten oder zirkulierende Endothelzellen breiten sich die Viren hämatogen aus und gelangen zu zahlreichen Organen, wie z. B. Speicheldrüsen, Nieren, Lunge, Leber, Darm, ZNS, Knochenmark und Plazenta. Das Virus persistiert dann in verschiedenen Zellen [28].

1.5.2 CMV-Immunität, -Klinik

Grundsätzlich wird zwischen Primärinfektionen und Reaktivierungen unterschieden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer Superinfektion durch einen anderen Serotyp [1d]. Konnatale CMV-Infektionen treten bei etwa 1% aller Neugeborenen auf und werden bei etwa 7% symptomatisch [13b]. Perinatale Infektionen führen in seltenen Fällen zu Pneumonien oder Hepatitiden [28]. Bei immunkompetenten Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen verlaufen die primären CMV-Infektionen nur bei etwa 1% apparent. Die Symptomatik kommt meistens als ein mononukleoseähnliches Syndrom vor [13b].

Die Infektion mit dem CMV kann normalerweise durch die zellvermittelte und

humorale Immunität unter Kontrolle gehalten werden. Nach einer Primärinfektion werden IgM-, IgA- und IgG-Antikörper gebildet. Erkrankungen und Virämie bei Reaktivierungen können trotz hoher Titer an neutralisierenden Antikörpern zustandekommen. Bei einer Primärinfektion werden zuerst Antikörper gegen Sofort- und Frühproteine produziert. Die neutralisierenden Antikörper entstehen erst nach 2-5 Monaten. Bei Reaktivierungen treten sie aber auch sofort auf.

Die zellvermittelte Immunität wird zunächst durch Sofortproteine induziert. Die Basis-Resistenz des Organismus, wie z. B. die Makrophagen-Funktion hat eine untergeordnete Rolle. Wie wichtig die zellvermittelte Immunität für die Beherrschung der Infektionen ist, wird durch die Tatsache klar, dass im Rahmen einer Immunsuppression oft zur erhöhten Virusausscheidung und CMV-Erkrankungen kommt. CMV-Infektionen wirken zusätzlich selbst immunsuppressiv [13b].

Neben der endogenen Reaktivierung kommen bei Immungeschädigten Blutprodukte und Knochenmark- bzw. Organtransplantate seropositiver Spender als Hauptinfektionsquellen in Frage. Primärinfektionen verlaufen schwerer als Reaktivierungen. Das Risiko einer schweren CMV-Erkrankung steigt mit dem Grad der Immunsuppression an. CMV-Syndrome beginnen oft mit langandauerndem Fieber, allgemeinem Krankheitsgefühl, Anorexie, Müdigkeit, Nachtschweiß und Arthralgien oder Myalgien. Veränderungen der Leberfunktionen, Leukopenie, Thrombozytopenie und atypische Lymphozytose können während dieser Phase vorkommen. Eine gefürchtete Komplikation ist die interstitielle Pneumonie. Im Gastrointestinaltrakt kann es zu Ulzerationen kommen und besonders bei AIDS-Patienten zu CMV-Enzephalitis und Chorioretinitis. Die CMV-Erkrankung geht mit einer großen Vielfalt an klinischen Manifestationen einher; tödliche Fälle sind häufig mit persistierender Virämie und multiplem Organbefall assoziiert [1b].

1.5.3 CMV-Diagnostik

Die Diagnostik von CMV-Infektionen kann durch den Antikörper- und Virusnachweis erfolgen.

Die Antikörperdiagnostik kann z. B. mittels ELISA gelingen. Als Antigene dienen Extrakte infizierter Zellen, das aufgereinigte Vollvirus und gentechnologische Polypeptide. Im Falle des IgM-Tests muss an Kreuzreaktionen und Stimulationen durch EBV gedacht werden. Ein erhöhter IgG-Titer und der Nachweis von IgM sprechen für eine CMV-Infektion. Speziell bei AIDS-Patienten ist der IgA-Titeranstieg wichtig, weil die oft kaum IgM oder einen weiteren IgG-Anstieg präsentieren [43].

Die KBR ist eine weitere serodiagnostische Methode für die CMV-Infektion. Die gefundenen Titer sind nicht so hoch wie bei den Enzym-Immuno-Assays. Das hat als Konsequenz, dass mütterlich übertragene Antikörper zwischen dem 3. und 6. Lebensmonat nur noch selten und im 2. Lebensjahr überhaupt nicht nachzuweisen sind. Deshalb ist eine positive KBR für den Nachweis einer aktiven Infektion im 1. Lebensjahr besonders dann, wenn IgM fehlen, wichtig [5b].

Der Nachweis vom CMV in Urin, Speichel oder Bronchiallavage kann innerhalb von 24 h mit der Zentrifugationskultur erfolgen (shell vial culture). Durch diese Technik können auch neutralisierende Antikörper bestimmt werden.

Bei einer CMV-Reaktivierung tritt oft eine an Leukozyten assoziierte Virämie auf. Sie kann immunhistologisch durch die Bestimmung des phagozytierten viralen Strukturantigens (pp65) in einem Blutzellausstrich nachgewiesen werden [43]. Das pp65 ist ein γ -Protein, das sich im Tegument des CMV befindet [13b]. Der CMV-Antigentest kann mit einer CMV-Krankheit gut zusammenhängen, die mit einer stärkeren Virämie als die subklinische Infektion verbunden ist [43]. Die verschiedenen CMV-Stämme lassen sich durch Restriktionsenzyme-Analysen unterscheiden [13b].

Für den Nachweis von Virus-DNA in verschiedenen Materialien wie z. B. Leukozyten oder Vollblut ist auch die PCR ein geeigneter Test. Bei Stammzelltransplantieren Patienten ist diese Methode wichtig für die

Früherkennung einer akuten Infektion. Mit der Quantifizierung der Genomkopienzahl wird dieser Test auch für die Therapiekontrolle und für Patienten mit häufigen Reaktivierungen geeignet. Zur Liquordiagnostik einer CMV-ZNS-Infektion kann die qualitative PCR eingesetzt werden.

Ein weiteres Beispiel von einer Methode für den Nachweis einer CMV-Infektion ist die Nucleic Acid Sequence Based Amplification [43].

1.5.4 CMV-Prophylaxe, -Therapie

Risikofaktoren für die Entstehung einer CMV-Infektion bzw. Erkrankung bei stammzelltransplantierten Patienten sind die Verminderung der zellulären Immunität [1b,13b,30,31,32], die akute GvHD [1b,33], die CMV-Virämie, höheres Alter, Ganzkörperbestrahlung zur Konditionierung sowie die Seropositivität des Empfängers vor SCT [1b] bzw. der Erhalt eines Transplantates eines seropositiven Spenders bei vorheriger Seronegativität des Empfängers [1b,33].

Eine CMV-Infektion kommt meistens zwischen dem 30. und 90. Tag nach der Transplantation vor, wenn die ursprüngliche Zahl der Granulozyten wieder erreicht ist, aber der Wiederaufbau des Immunsystems noch nicht sich ereignet hat [1d].

Die Inzidenz der CMV-Infektion nach allogener KMT liegt in den ersten 1-4 Monaten nach KMT bei über 70% aller Empfänger, die entweder seropositiv vor der KMT sind oder das Transplantat eines seropositiven Spenders bekommen [34,35]. Zwischen 25% und 50% der infizierten Patienten erkranken an einer invasiven CMV-Erkrankung, wie die lebensbedrohliche CMV-Pneumonie [35]. Eine CMV-Pneumonie kommt bei etwa 15-20% aller Knochenmarksempfänger vor. Bei 84-88% endet sie tödlich. Das größte Risiko liegt zwischen der 5. und 13. Woche nach der Transplantation [1b]. Auch bei Patienten mit autologer Stammzelltransplantation kommt es nicht selten zu einer CMV-Reaktivierung [34].

Einige prophylaktische Maßnahmen helfen bei der Prävention von CMV-

Erkrankungen. Bei CMV-seronegativen Empfängern ist die Transplantation vom Knochenmark von seronegativen Spendern anzustreben. Außerdem trägt die Gabe von seronegativen Blutprodukten [34,36] und gefilterten leukozytenfreien Blutprodukten [37] zur Verminderung der CMV-Primärinfektionen bei. Bei CMV-seropositiven Patienten ist eine medikamentöse Prophylaxe mit antiviralen Substanzen indiziert.

Ganciclovir, ein Guanosinderivat, wird sowohl zur Behandlung als auch zur Prophylaxe der CMV-Infektion bei transplantierten Patienten eingesetzt. Nach dem intrazellulären Umbau durch die virale Phosphotransferase, kodiert durch das CMV-Gen UL97, hemmt der Ganciclovir-Triphosphat selektiv die CMV-DNA-Polymerase. Die prophylaktische bzw. suppressive Therapie mit Ganciclovir ist effektiver, wenn Ganciclovir in Kombination mit CMV-Immunglobulin verabreicht wird. Bei vielen Patienten mit CMV-Erkrankung kommen klinische und virologische Rezidive sofort nach Beendigung der Therapie vor. Deshalb werden Erhaltungs-Therapieschemata empfohlen. Eine Resistenz gegen Ganciclovir tritt bei Patienten, die länger als 3 Monate behandelt wurden, oft auf und ist meistens mit einer Mutation des CMV UL97-Gens assoziiert [1b]. Eine CMV-Prophylaxe mit Ganciclovir i.v. ist hauptsächlich bei Seropositivität von KMT-Empfängern oder Spendern indiziert und nicht bei allen allogenen knochenmarktransplantierten Patienten, weil sie erheblich myelotoxisch ist und mit der Gefahr einer zunehmenden Resistenzentwicklung assoziiert ist [34].

Foscarnet, ein Pyrophosphatanalog, steht ebenfalls zur Behandlung und Prophylaxe von CMV-Infektionen zur Verfügung. Es inhibiert die virale DNA-Polymerase. Da es nicht erst phosphoryliert werden muss, wird es im Falle einer Ganciclovir-Resistenz benutzt [1b]. Außerdem zeigt es keine vergleichbare Myelotoxizität. Die wichtigsten Nebenwirkungen dieses Medikaments sind die Nephrotoxizität und die ulzerierende Wirkung auf den Genitalbereich [34].

Darüber hinaus kann die Transfusion CMV-spezifischer-T-Zellen des Spenders zur Verminderung der viralen Replikation führen [1d].

Der Einsatz von hochdosiertem Aciclovir (z.B. 500 mg/m² 3 mal täglich i.v.)

wurde inzwischen zunehmend durch die Gabe von Ganciclovir ersetzt, das ca. 50fach potenter gegen CMV ist [34].

Engmaschige Kontrollen durch sensitive Untersuchungstests dienen dem frühzeitigen Nachweis einer aktiven CMV-Infektion und der Prävention einer CMV-Erkrankung. Die frühere Diagnose führt zur Behandlung von mehreren Patienten, wodurch aber die Zahl der sehr späten Erkrankungen (>120 Tage nach Transplantation) eventuell erhöht wird [1d].

1.6 Stammzelltransplantation und Graft-versus-Host-Disease

Ziele der Transplantation hämatopoetischer Stammzellen sind hauptsächlich der Ersatz vom pathologisch veränderten, aber nicht maligne entarteten Knochenmark, auf das Bestrahlung oder Chemotherapie myelotoxisch gewirkt hat oder die Behandlung eines Tumors mittels myelotoxischer Chemotherapie oder Radiatio zu erlauben, deren Dosierung sehr hoch ist. Zu Knochenmarksveränderungen, die auf diese Weise behandelt werden, führen viele kongenitale und erworbene Erkrankungen. Quellen der hämatopoetischen Stammzellen sind am häufigsten das Knochenmark oder peripheres Blut eines anderen Individuums, das im allgemeinen immunologisch passende Merkmale des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes hat. Auch autologes Knochenmark oder peripheres Blut kann vor einer myeloablativen Therapie genommen werden, damit es nach Therapie reinfundiert wird. Durch diese autologen Transplantationen können Graft-versus-Host-Erkrankungen vermieden werden [1c].

Sowohl bei den Transplantationsabstoßungsreaktionen als auch bei den Graft-versus-Host-Reaktionen spielt der Major-Histokompatibilitäts-Komplex, dessen Gene wie das vom TNF- α sich auf dem Chromosom 6 befinden, eine große Rolle. Am weitesten telomerwärts gelegen finden sich die Klasse-I-MHC-Genorte, darunter die Genorte der klassischen Transplantationsantigene HLA-A, -B, -C. Die Klasse-II-MHC-Region erstreckt sich von DRA bis DPB2 und wird in verschiedene Subregionen unterteilt, wie die DR-, DQ- und DP-Subregionen.

Außer der Konstitutiven Expression von Klasse-I- und Klasse-II-Molekülen kommt es zu einer Verstärkung der Expression dieser Moleküle durch bestimmte Zytokine, wie die Interferone und der Tumor-Nekrose-Faktor-alpha [11c]. Das Risiko der GvHD nimmt mit der Zahl der passenden HLA-Loci ab. Eine GvHD tritt bei etwa 75-90% der Transplantationspaare mit 2 oder 3 nicht passenden HLA-Loci, bei 60% der auf einem HLA-Locus nicht passenden Paare und bei 40% der phänotypisch HLA-identischen Paare [40] auf. Also auch wenn Empfänger und Spender in Bezug auf die HLA-Loci vollständig kompatibel sind, kommen gewöhnlich Unterschiede zwischen ihnen im Bereich der minoren Histokompatibilitäts-Loci vor, die zu GvH-Reaktionen führen können [1c].

Von einer GvH-Reaktion spricht man, wenn es zu einer vom Transplantat ausgehenden, gegen das Wirtsgewebe gerichtete Immunreaktion kommt, die eine GvH-Krankheit verursachen kann. Die GvHD kann sowohl in einer akuten als auch in einer chronischen Form vorkommen. Die akute GvHD kann in vier Schweregrade eingeteilt werden und ist charakterisiert durch Epithelzellnekrosen in drei Hauptzielorganen: Haut, Leber und Verdauungstrakt. Histologisch kommt es zum Hautbefall durch eine lichenähnliche Reaktion. In der Leber sind nicht die Hepatozyten, sondern die Epithelzellen der Gallengänge betroffen und im Gastrointestinaltrakt tritt eine Entzündung von Krypten und Mucosa auf. Das klinische Bild umfasst Exantheme, Ikterus und Diarrhoe. Bei schweren Fällen können Hautnekrosen und großflächige Abstoßungen der Epidermis oder des Epithelüberzugs des Darms vorkommen und die GvHD kann letal ausgehen [8c]. In Zusammenhang mit der akuten GvHD steht die chronische GvHD, die sich gewöhnlich 100 Tage oder später nach einer Transplantation entwickelt. Sie entsteht jedoch auch ohne Anzeichen einer akuten Phase. Außerdem sollen auch für Zytokine kodierende Gene und höheres Alter für eine chronische GvHD prädisponieren [125]. Die chronische GvHD kann in eine lokalisierte und generalisierte Form unterteilt werden und ihre klinischen Symptome ähneln denen, die man bei systemischen Kollagen- und Gefäßerkrankungen sieht. Es sind meist Exantheme, Sklerodermatitis, Alopezie, Sicca-Syndrom, Leberfunktionsstörungen,

Ösophagus- und Vaginalstrikturen, Darmbefall und pulmonale Insuffizienz [1c,11d].

Bei der akuten GvHD werden die von den Zellen des Empfängers exprimierten Antigene von den funktionsfähigen gegebenen Spenderlymphozyten als fremd erkannt. Es kommt zu einer Aktivierung der Immunantwort. Die stimulierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und natürliche Killerzellen des Spenders produzieren Zytokine wie IFN- γ und TNF- α , dessen Assoziation mit der im Rahmen von der akuten GvHD auftretenden Gewebeerstörung diskutiert wird. Neben der medikamentösen Prophylaxe mittels z. B. Cyclosporin und Methotrexat oder Kortikosteroiden ist die T-Zell-Depletion des Spendertransplantates eine weitere präventive Maßnahme, durch die aber die GvT-Effekte reduziert werden [1c].

Außerhalb der Unterschiede in den Major- und Minor-Histokompatibilitäts-Loci des Transplantationspaares sind Risikofaktoren einer akuten GvHD das höhere Alter des Spenders und v.a. des Empfängers, HLA-A26, nicht-identische Geschlechter des Empfängers und des Spenders, CML, CMV-Seropositivität, ABNull-Inkompatibilität und frühere Sensibilisierung des Empfängers (Schwangerschaft oder Transfusion) [123,3]. Non-HLA-Gene, die für Zytokine kodieren wurden auch in Verbindung mit der Erkrankung gebracht [4,29,109,108b]. Außerdem soll die myeloablative Therapie zu der Entwicklung von akuter GvHD II-IV Grades beitragen, während die Art der GvHD-Prophylaxe einen weniger starken Einfluss hat [29].

Die chronische GvHD wird durch T-Lymphozyten des Spenders vermittelt, von denen die meisten durch Unterschiede in den minoren Histokompatibilitäts-Loci stimuliert werden. Außerdem können autoreaktive T-Zellen des Spenders existieren, die ein für den Spender und den Empfänger gemeinsames Autoantigen, vor allem dann erkennen, wenn eine Gewebeschädigung vorkommt. Die aktivierten T-Zellen produzieren Zytokine, von denen IL-4 vermutlich eine zentrale Rolle hat. Patienten mit vorangegangener akuter GvHD vom Grad II oder mehr und ältere Patienten sind besonders gefährdet. Obwohl die chronische GvHD tödlich enden kann, ist sie in der Mehrzahl der Fälle selbstlimitierend [1c].

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Da eventuell vorhandene Punktmutationen innerhalb der Promotor-Regionen von Tumor-Nekrose-Faktor-alpha und Interferon-gamma die Promotoraktivität ändern können und dadurch die Produktion der Zytokine potenzieren oder abschwächen können, sind sie dadurch auch in der Lage die Stärke und den Ablauf der immunologischen Reaktionen zu beeinflussen.

Angesichts der Beteiligung von TNF- α und IFN- γ an der Immunantwort, entstand die Überlegung, dass Punktmutationen den Auftritt und den Verlauf von CMV-Infektionen und GvH-Erkrankungen möglicherweise beeinflussen können. Ziel dieser Arbeit ist die Suche nach Basenveränderungen in den Promotor-Regionen von Tumor-Nekrose-Faktor-alpha und Interferon-gamma und der Vergleich der Häufigkeit ihres Auftretts bei Patienten mit oder ohne CMV-Seropositivität vor allogener Transplantation peripherer Blutstammzellen oder Knochenmarks und bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation mit und ohne CMV-Infektionen bzw. GvHD. Dabei ist es erwünscht, die Rolle von bereits bekannten Punktmutationen, wie z. B. die Polymorphismen an den Positionen -308 und -238 vom TNF- α -Promotor, zu untersuchen und nach neuen Punktmutationen und ihrer Bedeutung zu suchen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Verbrauchsgegenstände

PCR-Prozessor	GeneAmp 2400	Perkin Elmer, USA
Gelkammer	Horizon 11.14	BRL, Gaithersburg, USA
Biofuge 13		Heraeus, Hanau
Zentrifuge	5415R	Eppendorf, Hamburg
Sequenzier	PE 373A	Perkin Elmer, Foster City, USA
Sequenzier	Gen-Analysator 3100	
Pipetten		Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	PCR-Reaktionsgefäße	Biozym, Hessisch Oldendorf
MicroAmp PCR-Gefäße		Perkin Elmer, Norwalk, USA
CentriSep Säulchen		Princeton Sep., Adelphia, USA

2.1.2 Enzyme, Nukleotide, Primer, Chemikalien

Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Ethanol	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Rinderserumalbumin	Sigma, Deisenhofen
Primersynthese	Roth, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Perkin Elmer, Foster City, USA
dATP, dGTP, dCTP, dTTP	Promega, Madison, USA
Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg

Agarose	Sigma,Deissenhofen
Natriumdodecylsulfat	Roth,Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
EDTA	Roth,Karlsruhe
Gelstar	FMC BioProducts,Rockland,USA
Formamid	Roth,Karlsruhe
Isopropanol	Merck,Darmstadt
Polyacrylamid-Lösung	Roth,Karlsruhe

2.2 Methoden

2.2.1 TNF- α und IFN- γ

2.2.1.1 DNA-Extraktion aus EDTA-Blut

200 μ l Blut werden mit ATL-buffer und 20 μ l Proteinase K versetzt und für 20 min bei 56°C inkubiert. Proteinase K ist ein Enzym, das die Leukozytenlyse einleitet. Anschließend werden 200 μ l AL-Puffer dazugegeben und für 10 min bei 70°C inkubiert. Die Probe wird kurz zentrifugiert und mit 200 μ l Ethanol (100%) gemischt. Nach dem Vortexen wird die gesamte Lösung auf eine Qiagen-Säule aufgetragen und bei 8000 U/l 1 min lang zentrifugiert. Die an der Silicamembran der Qiagen-Säule gebundene DNA wird mit 500 μ l AW1-Puffer gewaschen und für 1 min bei 8000 U/l zentrifugiert. Daraufhin erfolgt die Zugabe von 500 μ l AW2-Puffer auf die Qiagen-Säule und eine Zentrifugation bei 14000 U/l 3 min lang. Zuletzt wird mit 100 μ l AE-Puffer eluiert und bei 8000 U/l für 1 min zentrifugiert. Die DNA liegt nun im Eluat gelöst vor.

2.2.1.2 Amplifikation der Human-DNA mittels Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation der DNA erfolgt in Volumina von 50 μ l. Auf 10 μ l aus der extrahierten DNA-Probe werden 40 μ l PCR-Mastermix pipettiert.

Tabelle 1: Zusammensetzung von PCR-Mastermix

PCR-Mastermix	Konzentration	Volumen
Aqua bidest	-	27,2 μ l
10 x Puffer	siehe unten	5 μ l
dNTP	0,5 mM	5 μ l
Forward-Primer	siehe unten	0,25 μ l
Reverse-Primer	siehe unten	0,25 μ l
MgCl ₂		2 μ l
Taq-Polymerase	1.5 U	0,3 μ l

Tabelle 2: Zusammensetzung von 10 x Puffer

10 x Puffer	Konzentration
Tris pH 9,6	10 mM
Natriumchlorid	50 mM
Magnesiumchlorid	10 mM
Rinderserumalbumin	10 µg/50 µl

TNF- α -Promotor-Region

Abschnitt zwischen bp -53 und -490

Forward-Primer: 5'>CTC AGG ACT CAA CAC AGC<3'

Reverse-Primer: 5'>GAA AGA ATC ATT CAA CCA GCG<3'

Konzentration: 56,4 pmol/µl

IFN- γ -Promotor-Region

Abschnitt zwischen bp -1064 und -685

Forward-Primer: 5'>GAC GGA ATC TTA CTC TGT CA<3'

Reverse-Primer: 5'> CAG TAT GCATCA ATA TAC TA<3'

Konzentration: 46,4 pmol/µl

Abschnitt zwischen bp -704 und -375

Forward-Primer: 5'>TAG TAT ATT GAT GCA TAC TG<3'

Reverse-Primer: 5'>ATT CTA GGG CCT CTC AAA CC<3'

Konzentration: 46,4 pmol/µl

Abschnitt zwischen bp -394 und +16

Forward-Primer: 5'>GGT TTG AGA GGC CCT AGA AT<3'

Reverse-Primer: 5'>TAA TAG CTG ATC TTC AGA TG<3'

Konzentration: 23 pmol/µl

Der Prozeß wird in einem Thermocycler Gene Amp 2400 von Perkin Elmer durchgeführt.

Temperaturprofil der PCR

Initialdenaturierung: 4 min bei 95°C

Denaturierung: 30 s bei 95°C

Annealing: 45 s bei 55°C

Extension: 90 s bei 72°C

Terminale Extension: 6 min bei 72°C

Anzahl der Zyklen der PCR

Für die TNF- α -Promotor-Region: 28

Für die IFN- γ -Promotor-Region zwischen den bp –1064 und –685: 34

Für die IFN- γ -Promotor-Region zwischen den bp –704 und –375: 31

Für die IFN- γ -Promotor-Region zwischen den bp –394 und +35: 34

Die Primer als Startpunkte der DNA-Synthese spielen eine zentrale Rolle in der Polymerasekettenreaktion. Sie sind ganz entscheidend für die Spezifität und Sensitivität der PCR. Die Primerlänge soll für spezifische PCR-Reaktionen ausreichend sein. Die Länge der ausgewählten Primer liegt zwischen 18 und 21 Basen. Je höher der GC-Gehalt ist, desto höher kann die Annealing-Temperatur sein und dadurch auch die Spezifität. Die ausgewählte Annealing-Temperatur beträgt 55°C. Zuletzt ist es wichtig, dass es an den Enden der Primer keine längeren, mit dem anderen Primer homologe Nukleotidsequenzen gibt.

2.2.1.3 Gel-Elektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Amplifikationsprodukte kann ihrer Größe nach in einem Agarosegel mittels Elektrophorese erfolgen. Dazu werden 10 μ l Amplifikat mit 2,5 μ l Loading buffer gemischt. Das Probenvolumen von 12,5 μ l

wird in ein 2% Agarosegel pipettiert und es wird eine Spannung von 100 V angelegt. Das Gel wird aus 2 g Agarose, 10 ml 10 x TAE-Puffer, 90 ml Aqua dest. und 5 µl Gelstar hergestellt.

Tabelle 3: Zusammensetzung vom Loading buffer

Inhaltstoffe	Konzentration
Tris, pH 7,6	50 mM
EDTA	50 mM
SDS	0,5 %
Bromphenolblau	0,1 %

Tabelle 4: Zusammensetzung des 50 x TAE-Puffers

Inhaltstoffe	Konzentration
Tris, pH 7,5	2 M
Essigsäure, 96 %	2 M
EDTA	0,1 M

Nach ca. 60 min kann das Gel unter dem UV-Licht (312 nm) ausgewertet und photographiert werden.

2.2.1.4 Aufreinigung der PCR-Produkte

Das PCR-Produkt wird mit dem QIAquick Purification Kit aufgereinigt. 40 µl des PCR-Amplifikates werden mit 200 µl PB-Puffer versetzt und gut gemischt. Das gesamte Probenvolumen wird auf eine QIAquick-Säule gebracht und 1 min lang bei 13000 U/min zentrifugiert. Danach werden 750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben und bei 13000 U/min für 1 min zentrifugiert. Nachdem der Inhalt des Auffanggefäßes abgekippt wird, erfolgt wieder eine Zentrifugation bei 13000 U/min für 1 min. Zuletzt wird die QIAquick-Säule in ein Eppendorf-Tube gebracht. 50 µl Puffer EB werden dazu gegeben und 1 min lang bei 13000 U/min zentrifugiert.

2.2.1.5 Sequenzierungs-PCR

Anschließend findet die Sequenzierungs-PCR statt. In zwei Microamp Tubes können je 3 µl DNA-Probe pipettiert werden. Jede Probe wird jeweils mit 1 µl vom Forward-Primer und 1 µl vom Reverse-Primer sequenziert. Dazu werden 15 µl von BigDye-Mastermix gegeben.

Tabelle 5: Zusammensetzung von BigDye-Mastermix

BigDye-Mastermix	Volumen
Aqua bidest	12 µl
BigDye	4 µl

Temperaturprofil der Sequenzierungs-PCR

Denaturierung: 10 s bei 96°C -> 25 Zyklen

Annealing: 5 s bei 56°C -> 25 Zyklen

Extension: 4 min bei 60°C -> 25 Zyklen

2.2.1.6 Aufreinigung der Sequenzierungs-PCR-Produkte

Die Proben werden mit Hilfe von CentriSep-Säulen aufgereinigt. 800 µl Ampuwa werden auf die CentriSep-Säule pipettiert und nach 30 min für 2 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Die Zentrifugation wird wiederholt und der Inhalt des Auffanggefäßes jedesmal abgekippt. Danach wird die DNA-Probe auf die CentriSep-Säule pipettiert und 1 min lang inkubiert. Schließlich erfolgt eine Zentrifugation für 2 min bei 3000 U/min.

2.2.1.7 Sequenzierung

Die Probe wird in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 3 µl Formamid/ 25 mM EDTA (5:1) gelöst und bei 90°C 2 min lang denaturiert. Dann wird sie auf

Eis abgekühlt und 3 µl auf das Sequenzierungsgel aufgetragen.

Die Durchführung der Sequenzierung erfolgt in einem ABI PRISM-System 373A. Für das Gel werden Glasplatten mit 100 % Ethanol gewaschen und mit 90 % Isopropanol nachbehandelt. Eine 6 % Polyacrylamidlösung wird mit 8 M Harnstoff versetzt, sterilfiltriert und mit 15 µl TEMED und 350 µl 10 % APS-Lösung gemischt. Dieses Gemisch wird sofort zwischen die Glasplatten gegossen. Nach zwei Stunden kann das polymerisierte Gel in den Sequenzierer eingesetzt werden. Das Gel läuft in 1 x TBE-Puffer bei 30 Watt für 14 h.

Mit Hilfe eines Macintosh IIci und der Programme Datacollection 1.2.1 und Analysis 2.1 kann die Auswertung erfolgen.

Die Durchführung dieser Methode fand im Tübinger Tropeninstitut statt.

Alternativ werden die folgenden Schritte nach der DNA-Extraktion durchgeführt.

2.2.2 TNF- α und INF- γ

2.2.2.1 Amplifikation der Human-DNA mittels Polymerasekettenreaktion

Es wird ein PCR-Mastermix benutzt, der folgende Reagenzien enthält:

25 U Taq DNA-Polymerase

20 mM Tris-HCl

100 mM KCl

3 mM MgCl₂

Brij 35, 0,01 %

dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 0,4 mM)

bei einem pH Wert von 8,3

25 µl von diesem PCR-Mastermix werden mit 13 µl Aquabi, 1 µl Forward- und 1 µl Reverse-Primer und 10 µl der DNA-Probe gemischt.

Temperaturprofil der PCR

Initialdenaturierung: 4 min bei 95°C

Denaturierung: 30 s bei 95°C

Annealing: 45 s bei 55°C

Extension: 90 s bei 72°C

Terminale Extension: 6 min bei 72°C

Anzahl der Zyklen der PCR

Für die TNF- α -Promotor-Region: 28

Für die INF- γ -Promotor-Region zwischen den bp -1064 und -685: 34

Für die INF- γ -Promotor-Region zwischen den bp -704 und -375: 31

Für die INF- γ -Promotor-Region zwischen den bp -394 und +35: 34

2.2.2.2 Aufreinigung der PCR-Produkte

Zu 40 μ l des PCR-Produktes werden 200 μ l CP-Puffer gegeben und gemischt. Die Mischung wird auf eine HiBind-Zentrifugensäule pipettiert und für 1 min bei 10000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Inhalt des Auffangtubes wird abgekippt. Dann werden 750 μ l des komplettierten DNA-Puffers auf die Säule gebracht und für 1 min bei 10000 x g zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wird verworfen und der Waschschrift einmal wiederholt. Durch einminütiges Zentrifugieren bei 10000 x g wird die Säule vollständig getrocknet. Anschließend erfolgt die Elution der DNA mit 50 μ l TE-Puffer. Dazu wird die Elutionslösung direkt auf die Säulenmatrix pipettiert und 1 min lang bei 10000 x g zentrifugiert.

2.2.2.3 Gel-Elektrophorese nach der Aufreinigung der PCR-Produkte

Die aufgereinigten PCR-Produkte werden in einem Agarosegel beim Anlegen einer elektrischen Spannung aufgetrennt und mit NEB verglichen.

Die Herstellung des Gels erfolgt mit 1,5 g Agarose, 100 ml TBE-Puffer und 5 µl Ethidiumbromid.

2.2.2.4 Sequenzierungs-PCR

5 ng PCR-DNA werden für die Sequenzierung von einem ca. 500 bp großem DNA-Abschnitt benötigt. Zusätzlich werden in das Reaktionsgefäß 2 µl BigDye, 0,5 µl Primer 10 pM und 6,5 µl HPLC-Wasser pipettiert.

Die Durchführung der PCR erfolgt unter Verwendung des folgenden Temperaturprofils:

Denaturierung: 30 s bei 96°C

Annealing: 15 s bei 50°C

Extension: 4 min bei 60°C

Es werden 25 Zyklen durchgeführt.

2.2.2.5 Aufreinigung der Sequenzierungs-PCR-Produkte

Die Aufreinigung der Sequenzierungs-PCR-Produkte erfolgt wie unter 2.2.6 beschrieben.

2.2.2.6 Sequenzierung

4 µl PCR-Produkt und 16 µl Formamid werden in die Vertiefung einer Probenplatte pipettiert.

Die eigentliche Sequenzierung wird in einem ABI PRISM-Gen-Analysator 3100 durchgeführt.

3 Ergebnisse

Legende Tabellen

Patient : Patient nach Knochenmarktransplantation oder Transplantation peripherer Blutstammzellen

Geschlecht : m männlich
w weiblich

Alter : Alter des Patienten am Tag der SCT, angegeben in Jahren

Diagnose : AML Akute Myeloische Leukämie
ALL Akute Lymphatische Leukämie
CML Chronische Myeloische Leukämie
CLL Chronische Lymphatische Leukämie
NHL Non-Hodgkin-Lymphom
MH Morbus Hodgkin
Plasm Plasmozytom
MdS Myelodysplastisches Syndrom

R : CMV-Status des Empfängers vor der SCT
- : CMV-seronegativer Rezeptor
+ : CMV-seropositiver Rezeptor

D : CMV-Status des Spenders
- : CMV-seronegativer Donor
+ : CMV-seropositiver Donor

-308 : Genotypus an der Position –308 der TNF- α -Promotor-Region

-238 : Genotypus an der Position –238 der TNF- α -Promotor-Region

-765 : Genotypus an der Position –765 der INF- γ -Promotor-Region

G : Guanin

A : Adenin

C : Cytosin

TNF.308.1 : Allele des TNF- α -Promotors mit der Base G an der Position –308

TNF.308.2 : Allele des TNF- α -Promotors mit der Base A an der Position –308
TNF.238.1 : Allele des TNF- α -Promotors mit der Base G an der Position –238
TNF.238.2 : Allele des TNF- α -Promotors mit der Base A an der Position –238
CMV-PI : CMV-Primärinfektion
CMV-RA : CMV-Reaktivierung
GvHD-Prophylaxe : medikamentöse Prophylaxe gegen die GvHD
max. Grad : max. Grad der akuten GvHD
T-D : Transplantat des Donors
n.u. : nicht untersucht

3.1 CMV-Ergebnisse

3.1.1 TNF- α -Promotor-Region

Polymorphismus-Stellen konnten an den Positionen -308, -238 und -376 in der Promotor-Region von TNF- α nachgewiesen werden. Dabei wurde zwischen dem Genotypus G/A und G/G sowohl für die Position -308 als auch für die Positionen -238 und -376 unterschieden.

3.1.1.1 TNF- α -Promotor-Region bei Patienten ohne CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach allogener Stammzelltransplantation

Es wurden insgesamt 17 Patienten ohne nach allogener SCT in dem Beobachtungszeitraum nachgewiesene CMV-Erstinfektion oder Reaktivierung untersucht.

Das Vorhandensein einer CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung wurde hauptsächlich anhand der Suche von CMV-Nukleinsäure mittels Amplifikationstechniken (Polymerase Chain Reaktion und/oder Nucleid Acid Sequence Based Amplification) und klinischer Data überprüft.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
1	w	44	AML	+	+	G/A	G/G

Das innerhalb von 265 Tagen nach SCT durchgeführte PCR-Verfahren für den Nachweis von CMV-DNA fiel negativ auf.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
2	w	23	ALL	-	+	G/G	G/G

Das innerhalb von 137 Tagen nach KMT durchgeführte PCR-Verfahren für die

Detektion von CMV-Nukleinsäure war negativ. Die Patientin verstarb 1^{1/2} Jahr nach der KMT am Wiederauftreten ihrer Krankheit.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
3	w	54	NHL	-	-	G/A	G/G

Das CMV-PCR-Verfahren wurde über 121 Tage nach KMT durchgeführt und fiel negativ auf. Die Patientin verstarb 127 Tage nach der Transplantation am Wiederauftreten ihrer Krankheit.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
4	w	39	AML	+	+	G/G	G/A

In einem Zeitraum von 113 Tagen nach PBSCT zeigte das durchgeführte PCR-Verfahren stets negative Resultate.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
5	m	26	CML	+	-	G/G	G/G

Bei dem innerhalb von 113 Tagen nach der KMT durchgeführten PCR-Verfahren konnte keine CMV-DNA nachgewiesen werden.

Patient	Geschlecht	Alter	-308	-238
6	m	17	G/A	G/G

Die innerhalb von 112 Tagen durchgeführten PCR- und NASBA-Verfahren fielen negativ auf.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
7	w	29	CML	-	+	G/A	G/G

Das innerhalb von 102 Tagen durchgeführte PCR-verfahren hatte stets

negative Ergebnisse. Die Patientin starb 183 Tage nach KMT (Abstoßung).

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
8	w	35	CML	-	-	G/A	G/G

Das innerhalb von 91 Tagen nach KMT durchgeführte PCR-Verfahren fiel stets negativ auf. 196 Tage nach KMT konnte kein Virus durch Anzuchtung aus Rachenspülwasser, Urin und Heparinblut nachgewiesen werden.

Patient	Geschlecht	Alter	-308	-238
9	m	24	G/G	G/G

In dem Beobachtungszeitraum von 315 Tagen konnte bei dem PCR-Verfahren keine CMV-DNA detektiert werden.

Patient	Alter	-308	-238
10	19	G/G	G/A

Im Beobachtungszeitraum von 120 Tagen war das CMV-PCR-Verfahren negativ.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
11	m	52	AML	-	-	G/G	G/G

Über 59 Tage nach KMT fiel das PCR-Verfahren negativ auf. Bei einem weiteren nach 341 Tagen durchgeführten PCR-Verfahren kam es ebenfalls zu einem negativen Ergebnis.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
12	m	47	ALL	-	-	G/G	G/G

Das PCR-Verfahren, das über 76 Tage nach KMT wöchentlich durchgeführt

wurde, war stets negativ.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
13	m	28	AML	-	-	G/A	G/A

Bei dem innerhalb von 75 Tagen stets durchgeführten PCR-Verfahren konnte keine CMV-DNA nachgewiesen werden. Bei dem Patienten kommt auch an der Position -376 der TNF- α -Promotor-Region der Genotypus G/A vor.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
14	w	34	AML	-	-	G/A	G/G

Bei dem innerhalb von 72 Tagen nach KMT durchgeführten PCR-Verfahren konnte keine CMV-DNA gefunden werden. Die Patientin starb 78 Tage nach KMT (Infektion EBV).

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
15	m	50	CML	-	+	G/G	G/G

Das innerhalb von 67 Tage nach PBSCT durchgeführte PCR-Verfahren hatte stets negative Ergebnisse. Der Patient verstarb 69 Tage nach der Transplantation an den Folgen einer akuten GvHD.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	D	R	-308	-238
16	m	47	CML	-	-	G/G	G/G

Die PCR-Resultate waren über 60 Tage stets negativ. In einem Beobachtungsraum von 98 Tagen traten keine Zeichen einer CMV-Ekrankung auf.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
17	M	54	NHL	-	-	G/G	G/G

Es konnte keine CMV-DNA bei dem in einem Zeitraum von 50 Tagen lang immer wieder durchgeführten PCR-Verfahren nachgewiesen werden. Der Patient verstarb 156 Tage nach der KMT am Wiederauftreten seiner Krankheit.

3.1.1.2 Zusammenfassung

Drei der Patienten (Patienten 2, 7 und 15) waren CMV-seronegativ und enthielten das Transplantat CMV-seropositiver Spender. Trotzdem kam es nicht zur CMV-Infektion. Patienten 2 und 15 haben den Genotypus G/G und Patient 7 den Genotypus G/A an der Position –308 des TNF- α -Promotors.

Zwei der Patienten (Patienten 1 und 4) waren CMV-seronegativ und enthielten das Transplantat CMV-seropositiver Spender. Eine CMV-Infektion trat nicht auf. Beim Patienten 1 kommt der Genotypus G/A an der Position –308 vor und beim Patienten 4 an der Position –238.

Einer der Patienten (Patient 5) war CMV-seropositiv und der Spender des Transplantats CMV-seronegativ. Eine CMV-Reaktivierung kam nicht vor. Der Genotypus G/G findet sich an den Stellen –308 und –238.

Acht der Patienten (Patienten 3, 8, 11, 12, 13, 14, 16 und 17) und ihre Spender waren seronegativ. Eine CMV-Infektion kam nicht vor. Die Patienten 3, 8, 14 und 18 hatten den Genotypus G/A an der Stelle –308. Derselbe Genotypus ist beim Patienten 13 sowohl an der Position –308 als auch an den Positionen –238 und -376 vorhanden.

	R- /D+ (n=3)	R+ /D+ (n=2)	R+ /D- (n=1)	R- /D- (n=8)
Genotypus	n	n	n	n
TNF- α -308				
G/G	2	1	1	5
G/A	1	1	0	3
TNF- α -238				
G/G	3	1	1	7
G/A	0	1	0	1

n= Anzahl der untersuchten Patienten

3.1.1.3 TNF- α -Promotor-Region bei Patienten mit CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach allogener Stammzelltransplantation

Es wurden insgesamt 20 Patienten mit nach SCT nachgewiesener CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung untersucht. Das Vorhandensein einer CMV-Infektion wurde vorwiegend durch die Detektion von CMV-Nukleinsäure mittels PCR und/oder NASBA und klinische Data nachgewiesen.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
21	m	49	CML	+	+	G/A	G/G

Durch die PCR- und NASBA-Verfahren gelang wiederholt zwischen dem 33. und 129. Tag nach KMT der Nachweis von CMV-Nukleinsäure.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
22	w	44	CLL	+	+	G/A	G/G

CMV-DNA konnte wiederholt zwischen dem 31. und 284. Tag nach KMT mittels dem PCR-Verfahren nachgewiesen werden.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
23	m	31	ALL	+	+	G/G	G/A

Das PCR-Verfahren fiel zwischen den Tagen 27 und 121 nach KMT wiederholt positiv auf. Der Patient starb an den Folgen der CMV-Infektion 135 Tage nach KMT.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
24	w	49	AML	-	+	G/G	G/A

Durch das PCR-Verfahren erfolgte der Nachweis von CMV-DNA zwischen dem 52. und 222. Tag nach KMT. Die Patientin starb 233 Tage nach KMT an den Folgen der CMV-Infektion.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
25	m	37	AML	+	-	G/G	G/G

Mittels der Durchführung von den PCR- und NASBA-Verfahren konnte die CMV-Nukleinsäure wiederholt zwischen den Tagen 13 und 126 nach PBSCT nachgewiesen werden. Der Patient starb 216 Tage nach PBSCT (Infektion Pilze).

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
26	m	54	AML	+	+	G/G	G/G

Das innerhalb von den Tagen 29 bis 62 nach KMT durchgeführte PCR-Verfahren hatte mehrmals positive Resultate. Der Patient starb 108 Tage nach KMT (Infektion Pilze).

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
27	w	51	Plasm	+	+	G/G	G/G

Die Testergebnisse des PCR-Verfahrens waren zwischen dem 23. und 114. Tag wiederholt positiv.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
28	m	39	CML	+	+	G/G	G/G

Die Detektion von CMV-DNA gelang in dem Zeitraum zwischen dem 20. und 313. Tag mehrmals mittels dem PCR-Verfahren.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
29	w	49	AML	+	-	G/G	G/G

Das innerhalb von den Tagen 28 bis 93 durchgeführten PCR-Verfahren hatte wiederholt positive Testergebnisse. Die Patientin starb 116 Tage nach KMT (Infektion Pilze).

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
30	m	38	CML	+	+	G/G	G/G

Der Nachweis von CMV-DNA gelang zwischen dem 42. und 132. Tag mehrmals mittels dem PCR-Verfahren. Der Patient starb 5 Monate nach der KMT (Infektion nicht klassifizierbar).

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
31	m	34	ALL	+	+	G/G	G/G

Die Detektion von CMV-DNA erfolgte durch das PCR-Verfahren. Der Patient erkrankte 2 Monate nach KMT an CMV-Pneumonie und starb 204 Tage nach KMT (Infektion viral, nicht CMV).

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
32	m	29	AML	+	-	G/G	G/G

Die CMV-DNA konnte zwischen den Tagen 2 und 86 nach KMT mittels dem PCR-Verfahren nachgewiesen werden. Der Patient starb 87 Tage nach KMT an den Folgen der CMV-Infektion.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
33	m	50	CML	+	+	G/G	G/G

Die Detektion der CMV-Nukleinsäure erfolgte während dem 28. und 62. Tag durch die Durchführung von den PCR- und NASBA-Verfahren. Der Patient starb 64 Tage nach PBSCT (Pneumonie anderer Ursache).

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
34	w	62	Plasm	+	-	G/G	G/G

Die CMV-Nukleinsäure konnte an dem 55. und 66. Tag nach KMT sowohl durch das PCR- als auch durch das NASBA-Verfahren nachgewiesen werden. Wegen der CMV-Reaktivierung wurde die Patientin zwischen dem 72. und 87. Tag mit Ganciclovir behandelt.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
35	w	56	AML	+	+	G/G	G/G

Die CMV-Reaktivierung konnte zwischen dem 6. und 39. Tag mittels den PCR- und NASBA-Verfahren nachgewiesen werden.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
36	m	50	AML	+	+	G/A	G/G

Die Testergebnisse des PCR-Verfahrens fielen zwischen dem 21. und 71. Tag

mehrmals positiv auf.

Nach 3 Jahren erfolgte nochmal eine KMT. Es kam wieder zum wiederholten Nachweis von CMV-DNA.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
41	m	32	ALL	+	+	G/G	G/G

Das durchgeführte PCR-Verfahren war wiederholt positiv.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
46	m	55	AML	+	-	G/G	G/G

Wegen einer CMV-Reaktivierung wurde der Patient mit Ganciclovir an den Tagen +17 bis +40 behandelt.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
47	w	43	MdS	+	+	G/A	G/G

Die Patientin wurde wegen einer CMV-Infektion mit Ganciclovir zwischen den Tagen +52 und +73 behandelt.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D	-308	-238
48	m	33	ALL	+	-	G/G	G/G

Aufgrund des Nachweises einer CMV-Reaktivierung wurde am Tag +29 eine antivirale Therapie mit Foscarnet begonnen.

3.1.1.4 Zusammenfassung

Einer der Patienten (Patient 24) war CMV-seronegativ und enthielt das Transplantat eines CMV-seropositiven Spenders. Patient 24 hat den Genotypus G/A an der Position -238 des TNF- α -Promotors.

Dreizehn der Patienten (Patienten 21, 22, 23, 26, 27, 28, 30, 31, 33, 35, 36, 41 und 47) waren CMV-seropositiv und enthielten das Transplantat CMV-seropositiver Spender. Bei den Patienten 21, 22, 36 und 47 kommt der Genotypus G/A an der Position –308 vor und bei dem Patienten 23 an der Position –238.

Sechs der Patienten (Patienten 25, 29, 32, 34, 46 und 48) waren CMV-seropositiv und die Spender der SCT CMV-seronegativ. Diese Patienten haben den Genotypus G/G sowohl an der Stelle –308 als auch an der Stelle –238.

	R-/ D+	R+/ D+	R+/ D-
	n=1	n=13	n=6
Genotypus	n	n	n
TNF-α-308			
G/G	1	8	6
G/A	0	5	0
TNF-α-238			
G/G	0	12	6
G/A	1	1	0

n=Anzahl der untersuchten Patienten

3.1.1.5 Darstellung der Ergebnisse

Genotypus	Patienten ohne nach SCT aufgetretene CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung		Patienten mit nach SCT aufgetretener CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung	
	CMV-seroneg. Patienten vor SCT	CMV-seropos. Patienten vor SCT	CMV-seroneg. Patienten vor SCT	CMV-seropos. Patienten vor SCT
	n	n	n	n
TNF-α-308				
G/G	6	2	1	14
G/A	5	1	0	5
TNF-α-23				
G/G	10	2	0	18
G/A	1	1	1	1

n= Anzahl der untersuchten Patienten

Patienten mit oder ohne **nach** SCT aufgetretene
CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung

Genotypus	CMV-seroneg. Patienten vor SCT		CMV-seropos. Patienten vor SCT	
	n	%	n	%
TNF-α-308				
G/G	8	57	18	72
G/A	6	43	7	28
($\chi^2=0,891$, $p=0,345$)				
TNF-α-238				
G/G	12	86	23	92
G/A	2	14	2	8
($\chi^2=0,385$, $p=0,535$)				

n= Anzahl der untersuchten Patienten

Unabhängig vom Auftreten einer CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT haben 6 von 14 Patienten (43%) (Patienten 2,3,7, 8,11,12,13,14,15,16,17,24 und zusätzlich Patienten 18 und 43), die CMV-seronegativ vor der SCT waren, den Genotypus G/A an der Position –308 der TNF- α -Promotor-Region.

7 von 25 vor SCT CMV-seropositiven Patienten (28%) (Patienten 1, 4,5,21,22,23,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,46,47,48,41 und zusätzlich Patienten 37,44 und 45) haben den Genotypus G/A an der Position –308.

Bei 2 von den 14 vor SCT seronegativen Patienten (17%) ist der Genotypus G/A an der Position –238 des TNF- α -Promotors vorhanden.

2 von den 25 (8%) vor SCT seropositiven Patienten haben den Genotypus G/A an der Stelle –238.

Patienten mit oder ohne **nach** SCT aufgetretene
CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung

	Allele der CMV-seroneg. Patienten vor SCT		Allele der CMV-seropos. Patienten vor SCT	
Allele	n	%	n	%
TNF.308.1	22	79	43	86
TNF.308.2	6	21	7	14
TNF.238.1	26	93	48	96
TNF.238.2	2	7	2	4

n= Anzahl der Allele

Das TNF.308.2-Allel kommt bei 6 der 28 TNF.308.Allele (21%) der vor SCT CMV-seronegativen Patienten vor.

Bei 7 der 50 TNF.308.Allele (14%) der vor SCT CMV-seropositiven Patienten findet sich das TNF.308.2-Allel.

Bei 2 der 28 TNF.308.Allele (7%) der vor SCT CMV-seronegativen Patienten ist das TNF.238.2-Allel vorhanden.

Das TNF.308.2-Allel kommt bei 2 der 50 (4%) TNF.238.Allele der vor SCT CMV-seropositiven Patienten vor.

Weibliche Patienten mit oder ohne **nach** SCT aufgetretene CMV-
Primärinfektion oder Reaktivierung

Genotypus	CMV-seroneg. weibliche Patienten vor SCT		CMV-seropos. weibliche Patienten vor SCT	
	n	%	n	%
TNF-α-308				
G/G	2	33	5	50
G/A	4	67	5	50
($\chi^2=0,423$, $p=0,515$)				
TNF-α-238				
G/G	5	83	9	90
G/A	1	17	1	10
($\chi^2=0,152$, $p=0,696$)				

n= Anzahl der untersuchten Patienten

Männliche Patienten mit oder ohne **nach** SCT aufgetretene CMV-
Primärinfektion oder Reaktivierung

Genotypus	CMV-seroneg. männliche Patienten vor SCT		CMV-seropos. männliche Patienten vor SCT	
	n	%	n	%
TNF-α-308				
G/G	6	75	13	87
G/A	2	25	2	13
($\chi^2=0,494$, $p=0,482$)				
TNF-α-238				
G/G	7	87,5	14	93
G/A	1	12,5	1	7
($\chi^2=0,224$, $p=0,636$)				

n= Anzahl der untersuchten Patienten

an ALL erkrankte Patienten mit oder ohne nach SCT aufgetretene CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung				
an ALL erkrankte CMV-seroneg. Patienten vor SCT			an ALL erkrankte CMV-seropos. Patienten vor SCT	
Genotypus	n	%	n	%
TNF- α -308				
G/G	2	100	4	100
G/A	0	0	0	0
(keine statistischen Ergebnisse beim χ^2 -Test/Genotypus=Konstante)				
TNF- α -238				
G/G	2	100	3	75
G/A	0	0	1	25
($\chi^2=0,600$, $p=0,439$)				
n= Anzahl der untersuchten Patienten				

an AML erkrankte Patienten mit oder ohne **nach** SCT aufgetretene
CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung

		an AML erkrankte CMV-seroneg. Patienten vor SCT		an AML erkrankte CMV-seropos. Patienten vor SCT	
Genotypus	n	%	n	%	
TNF-α-308					
G/G	3	50	7	70	
G/A	3	50	3	30	
			($\chi^2=0,640$, $p=0,424$)		
 TNF-α-238					
G/G	4	67	9	90	
G/A	2	33	1	10	
			($\chi^2=1,340$, $p=0,247$)		

n= Anzahl der untersuchten Patienten

an CML erkrankte Patienten mit oder ohne **nach** SCT aufgetretene
CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung

		an CML erkrankte CMV-seroneg. Patienten vor SCT		an CML erkrankte CMV-seropos. Patienten vor SCT	
Genotypus	n	%	n	%	
TNF-α-308					
G/G	2	50	4	80	
G/A	2	50	1	20	
			($\chi^2=0,900$, $p=0,343$)		
 TNF-α-238					
G/G	4	100	5	100	
G/A	0	0	0	0	
(keine statistischen Ergebnisse beim χ^2 -Test/Genotypus=Konstante)					

n= Anzahl der untersuchten Patienten

Genotypus	Patienten ohne CMV- Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT		Patienten mit CMV- Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT	
	n	%	n	%
TNF-α-308				
G/G	10	59	16	80
G/A	7	41	4	20
($\chi^2=1,973$, $p=0,160$)				
TNF-α-238				
G/G	14	82	18	90
G/A	3	18	2	10
($\chi^2=0,460$, $p=0,498$)				

n= Anzahl der untersuchten Patienten

7 von den 17 Patienten (41%) ohne nach SCT aufgetretene CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung haben den Genotypus G/A an der Position –308 der TNF- α -Promotor-Region. Bei den restlichen 10 kommt der Genotypus G/G vor.

4 von den 20 Patienten (20%) mit nach SCT aufgetretener CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung haben den Genotypus G/G an der Position –308 der TNF- α -Promotor-Region. Bei den restlichen 16 findet sich der Genotypus G/G.

Bei 3 der 17 Patienten (18%) ohne nach SCT aufgetretene CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung ist der Genotypus G/A an der Position –238 des TNF- α -Promotors vorhanden. Die restlichen 14 haben den Genotypus G/G. Bei 2 der 20 Patienten (10%) mit nach SCT aufgetretener CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung kommt der Genotypus G/A an der Position –238 vor. Die restlichen 18 haben den Genotypus G/G.

Allele	Allele der Patienten ohne CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT		Allele der Patienten mit CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT	
	n	%	n	%
TNF.308.1	27	79	36	90
TNF.308.2	7	21	4	10
TNF.238.1	31	91	38	95
TNF.238.2	3	9	2	5

n=Anzahl der Allele der untersuchten Patienten

Das TNF.308.2-Allel findet sich bei 7 der 34 TNF.308.Allele (21%) der Patienten ohne nach SCT aufgetretene CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung.

Das TNF.308.2-Allel kommt bei 4 der 40 TNF.308.Allele (10%) der Patienten mit nach SCT aufgetretener CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung vor.

Das TNF.238.2-Allel ist bei 3 der 34 TNF.238.Allele (9%) der Patienten ohne nach SCT aufgetretene CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung vorhanden.

Das TNF.238.2-Allel kommt bei 2 der 40 TNF.238.Allele (5%) der Patienten mit nach SCT aufgetretener CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung vor.

Genotypus	weibliche Patienten ohne CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT		weibliche Patienten mit CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT	
	n	%	n	%
TNF-α-308				
G/G	2	29	5	71
G/A	5	71	2	29
($\chi^2=2,571$, $p=0,109$)				
TNF-α-238				
G/G	6	86	6	86
G/A	1	14	1	14
($\chi^2=0$, $p=1$)				

n= Anzahl der untersuchten Patienten

Genotypus	männliche Patienten ohne CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT		männliche Patienten mit CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT	
	n	%	n	%
TNF-α-308				
G/G	7	78	11	85
G/A	2	22	2	15
($\chi^2=0,167$, $p=0,683$)				
TNF-α-238				
G/G	8	89	12	92
G/A	1	11	1	8
($\chi^2=0,075$, $p=0,784$)				

n= Anzahl der untersuchten Patienten

Genotypus	an ALL erkrankte Patienten ohne CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT		an ALL erkrankte Patienten mit CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT	
	n	%	n	%
TNF-α-308				
G/G	2	100	4	100
G/A	0	0	0	0
(keine statistischen Ergebnisse beim χ^2 -Test/Genotypus=Konstante)				
TNF-α-238				
G/G	2	100	3	75
G/A	0	0	1	25
($\chi^2=0,600$, $p=0,439$)				

n= Anzahl der untersuchten Patienten

Genotypus	an AML erkrankte Patienten ohne CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT		an AML erkrankte Patienten mit CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT	
	n	%	n	%
TNF-α-308				
G/G	2	40	7	87,5
G/A	3	60	1	12,5
($\chi^2=3,259$, $p=0,071$)				
TNF-α-238				
G/G	3	60	7	87,5
G/A	2	40	1	12,5
($\chi^2=1,311$, $p=0,252$)				

n= Anzahl der untersuchten Patienten

Genotypus	an CML erkrankte Patienten ohne CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT		an CML erkrankte Patienten mit CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT	
	n	%	n	%
TNF-α-308				
G/G	3	60	3	75
G/A	2	40	1	25
($\chi^2=0,225$, $p=0,635$)				
TNF-α-238				
G/G	5	100	4	100
G/A	0	0	0	0
(keine statistischen Ergebnisse beim χ^2 -Test/Genotypus=Konstante)				
n= Anzahl der untersuchten Patienten				

3.1.2 IFN- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen -1064 und -685

3.1.2.1 IFN- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen -1064 und -685 bei Patienten ohne aufgetretene CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT

Die Promotor-Region von IFN- γ zwischen den Positionen -1064 und -685 wurde bei insgesamt 13 Patienten ohne nach SCT aufgetretene CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung untersucht.

In diesem Bereich der INF- γ -Promotor-Region kommen bei den Patienten 1, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16 und 17 keine Punktmutationen vor.

3.1.2.2 IFN- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen –1064 und –685 bei Patienten mit aufgetretener CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT

Die Promotor-Region von IFN- γ zwischen –1064 und –685 wurde bei insgesamt 14 Patienten mit nach SCT aufgetretener CMV-Erstinfektion oder Reaktivierung untersucht.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D
39	m	23	ALL	+	+

Die CMV-Nukleinsäure konnte zwischen den Tagen 22 und 83 nach KMT durch das PCR- und das NASBA-Verfahren wiederholt nachgewiesen werden. Der Patient starb 199 Tage nach KMT (Infektion Pilze).

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D
40	f	20	MdS	+	+

Die Detektion von CMV-DNA erfolgte mehrmals zwischen dem 26. und 53. Tag durch das durchgeführte PCR-Verfahren. Die Patientin verstarb 63 Tage nach KMT an den Folgen der CMV-Infektion.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D
49	m	41	AML	+	+

Wegen einer 2 Monate nach KMT aufgetretenen CMV-Reaktivierung wurde der Patient mit Vistide behandelt. Der Patient verstarb 217 Tage nach KMT (Infektion Pize).

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	R	D
50	w	45	CML	+	+

Die Patientin erkrankte 3 Monate nach KMT an einer CMV-Colitis.

In diesem Bereich der IFN- γ -Promotor-Region kommen bei den Patienten 25, 26, 30, 31, 34, 35, 36, 39, 40, 41, 47, 48, 49 und 50 keine Punktmutationen vor.

3.1.2.3 IFN- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen –1064 und –685 bei CMV-seronegativen und -seropositiven Patienten vor der SCT

Bei 7 vor der SCT CMV-seronegativen Patienten (Patienten 3, 11, 12, 13, 14, 16, 17) und 17 vor der SCT CMV-seropositiven Patienten (Patienten 1, 4, 5, 25, 26, 30, 31, 34, 35, 36, 37, 39, 40, 47, 48, 49, 50) kommen in diesem Bereich des INF- γ -Promotors keine Punktmutationen vor.

3.1.3 IFN- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen –704 und –375

3.1.3.1 IFN- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen –704 und –375 bei Patienten ohne aufgetretene CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT

Die Promotor-Region von IFN- γ zwischen den Positionen –704 und –375 wurde bei insgesamt 14 Patienten ohne nach SCT nachgewiesene CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung untersucht.

In diesem Bereich des IFN- γ -Promotors sind bei den Patienten 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16 und 17 keine Punktmutationen vorhanden.

3.1.3.2 IFN- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen –704 und –375 bei Patienten mit aufgetretener CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT

Die Promotor-Region von IFN- γ zwischen den Positionen –704 und –375 wurde bei insgesamt 7 Patienten mit nach SCT nachgewiesener CMV-Infektion oder Reaktivierung untersucht.

In diesem Bereich des IFN- γ -Promotors finden sich bei den Patienten 30, 31, 34, 35, 36, 41 und 48 keine Punktmutationen.

3.1.3.3 IFN- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen –704 und –375 bei CMV-seropositiven und -seronegativen Patienten vor SCT

In diesem Bereich der IFN- γ -Promotor-Region sind bei 8 vor der SCT CMV-seronegativen Patienten (Patienten 3, 8, 11, 12, 13, 14, 16, 17) und bei 10 vor SCT CMV-seropositiven Patienten (Patienten 1, 4, 5, 30, 31, 34, 35, 36, 37,48) keine Punktmutationen vorhanden.

3.1.4 IFN- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen –394 und +35

3.1.4.1 IFN- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen –394 und +35 bei Patienten ohne aufgetretene CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT

Die Promotor-Region von IFN- γ zwischen den Positionen –394 und +35 wurde bei insgesamt 13 Patienten ohne nach SCT aufgetretene CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung untersucht.

Es wurden in diesem Bereich des IFN- γ -Promotors bei den Patienten 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16 und 17 keine Punktmutationen gefunden.

3.1.4.2 IFN- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen –394 und +35 bei Patienten mit aufgetretener CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT

Die Promotor-Region von IFN- γ zwischen den Positionen –394 und +35 wurde bei insgesamt 10 Patienten mit nach SCT aufgetretener CMV-Erstinfektion oder Reaktivierung untersucht.

Keine Punktmutationen kommen in diesem Bereich der IFN- γ -Promotor-Region bei den Patienten 25, 26, 30, 31, 34, 35, 40, 41, 49 und 50.

3.1.4.3 IFN- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen –394 und +35 bei CMV-seronegativen und seropositiven Patienten vor SCT

In diesem Bereich der IFN- γ -Promotor-Region gibt es bei 8 vor der SCT CMV-seronegativen Patienten (Patienten 3, 8, 11, 12, 13, 14, 16, 17) und bei 12 vor der SCT CMV-seropositiven Patienten (Patienten 4, 5, 25, 26, 30, 31, 34, 35, 37, 40, 49, 50) keine Punktmutationen.

3.2 Akute GvHD

3.2.1 Schweregrade und Stadieneinteilung

Die akute GvHD lässt sich in 4 Schweregrade unterteilen.

Gesamtgrad	Klinischer Grad der Schwere der GvHD Stärke der Organbeteiligung
I	+ bis ++ Hautausschlag; keine Beteiligung der Eingeweide; keine Beteiligung der Leber; keine Minderung der klinischen Leistung
II	+ bis +++ Hautausschlag; + Eingeweide-Beteiligung oder + Leberbeteiligung (oder beides); milde Minderung der klinischen Leistung
III	++ bis +++ Hautausschlag; ++ bis +++ Eingeweide- Beteiligung oder ++ bis ++++ Leberbeteiligung (oder beides); deutliche Minderung der klinischen Leistung
IV	Dem Grad III ähnlich mit ++ bis ++++ Organbeteiligung und extreme Minderung der klinischen Leistung

Klinisches Stadium der GvHD in Bezug auf das Organsystem

Stadium	Haut	Leber	Intestinaltrakt
I	makulopapulöser Hautausschlag < 25% der Oberfläche	Bilirubin 2-3 mg/100 ml	> 500 ml Diarrhoe/Tag

II	makulopapulöser Hautausschlag 25-50% der Körperoberfläche	Bilirubin 3-6 mg/100 ml	>1000 ml Diarrhoe/Tag
III	Generalisierte Erythrodermie	Bilirubin 6-15 mg/100 ml	>1500 ml Diarrhoe/Tag
IV	Generalisierte Erythrodermie mit bullöser Bildung und Desquamatio	Bilirubin >15 mg/100 ml	schwere abdominale Schmerzen, mit oder ohne Ileus

3.2.2 TNF- α -Promotor-Region

3.2.2.1 Patientendaten

Es wurden insgesamt 38 Patienten auf den Auftritt einer akuten GvHD nach allogener SCT untersucht.

Bei 17 der 38 Patienten entwickelte sich eine akute GvHD 0. oder I. max.Grades.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA
2	w	23	ALL	nein

max.Grad	T-D	-308	-238
0	?	G/G	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
12	m	47	ALL	nein	Thymoglobulin 20mg/kg KG von Tag -4 bis -2

max.Grad	T-D	-308	-238
0	HLA-nicht ident., verwandt	G/G	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
23	m	31	ALL	ja	Thymoglobulin 3,5mg/kg KG von Tag -4 bis -1, CSA 5mg/kg KG ab Tag -1

max.Grad	T-D	-308	-238
0	HLA-ident., fremd	G/G	G/A

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
24	w	49	AML	ja	Thymoglobulin 3,5mg/kg KG von d-4 bis-1, CSA ab d-1, Prednisolon 0,5mg/kg Kg von d+7 bis+14, 1mg/kg KG von d+15 bis+28, Mycophenolatmofetil 2x0,5mg/kg KG von d+1 bis+14, 2x1mg/kg KG von d+15 bis +180

max.Grad	T-D	-308	-238
0	HLA-ident., fremd	G/G	G/A

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
27	w	51	Plasm	ja	CSA 5mg/kg KG ab d -1, Prednisolon 1mg/kg KG ab d +14

max.Grad	T-D	-308	-238
0	HLA-ident., sibling	G/G	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
31	m	34	ALL	ja	Thymoglobulin 3,5mg/kgKG von d -4 bis -1, CSA ab d - 1, Prednisolon 0,5mg/kg KG von d+7 bis+14,1mg/kg KG von d +14 bis +28, Mycophenolatmophetyl 1mg/kg KG ab +18

max.Grad	T-D	-308	-238
0	HLA-ident., fremd	G/G	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA
32	m	29	AML	ja

max.Grad	T-D	-308	-238
0	?	G/G	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	GvHD-Prophylaxe
37	w	36	Plasm	CSA 3mg/kg KG ab d 0, Mycophenolatmofetil 2x1g /d ab d +1, Corticosteroide, Antithymoglibulin

max.Grad	T-D	-308	-238
0	HLA-ident., sibling	G/A	G/G

Die Patientin starb 201 Tage nach PBSCT an Pneumokokkensepsis.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
1	w	44	AML	nein	CSA 5mg/kg KG ab d -1

max.Grad	T-D	-308	-238
I	HLA-ident., sibling	G/A	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
4	w	39	AML	nein	CSA ab Tag -1, Corticosteroide

max.Grad	T-D	-308	-238
I	HLA-ident., sibling	G/G	G/A

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
5	m	26	CML	nein	CSA ab Tag -1, Antithymoglobulin

max.Grad	T-D	-308	-238
I	HLA-ident., fremd	G/G	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
14	w	34	AML	nein	CSA ab d-1, Thymoglobulin 3,5mg/kg KG von d-4 bis - 3, Prednisolon 0,5mg/kg KG von +7 bis +14, 1mg/kg KG von +15 bis +28, Mycophenolatmofetil 0,5g von +7 bis +14, 1g/d ab +15

max.Grad	T-D	-308	-238
I	HLA-ident., fremd	G/A	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
16	m	47	CML	nein	CSA ab d -1, Corticosteroide, Antithymoglobulin

max.Grad	T-D	-308	-238
I	HLA-ident., sibling	G/G	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
29	w	49	AML	ja	CSA 5mg/kg KG ab d -1, Prednisolon 1mg/kg KG ab d +4

max.Grad	T-D	-308	-238
I	HLA-ident., sibling	G/G	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	GvHD-Prophylaxe
43	m	48	AML	CSA 3mg/kg KG ab d -1, Corticosteroide, Antithymoglobulin

max.Grad	T-D	-308	-238
I	HLA-ident., fremd	G/G	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	GvHD-Prophylaxe
45	w	44	Sekundär AML bei MdS	CSA ab -1

max.Grad	T-D	-308	-238
I	HLA-ident., sibling	G/A	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	GvHD-Prophylaxe
47	w	43	MdS	CSA, Antithymoglobulin

max.Grad	T-D	-308	-238
I	HLA-ident., sibling	G/A	G/G

21 von den 38 Patienten erkrankten an einer akuten GvHD der Schweregrade II, III oder IV.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
7	w	29	CML	nein	CSA ab Tag 0, Corticosteroide, Antithymoglobulin

max.Grad	T-D	-308	-238
II	HLA-ident., fremd	G/A	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
8	w	35	CML	nein	CSA, Antithymoglobulin

max.Grad	T-D	-308	-238
II	HLA-ident., sibling	G/A	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
11	m	52	AML	nein	Cyclosporin 5mg/kg KG ab d -1, Antithymoglobulin 20mg/kg KG von -4 bis -1, Prednisolon

max.Grad	T-D	-308	-238
II	HLA-ident., fremd	G/G	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
13	m	28	AML	nein	CSA 2mg/kg KG ab d -1, Corticosteroide

max.Grad	T-D	-308	-238
II	HLA-ident., sibling	G/A	G/A

Der max. Grad der akuten GvHD war II. Es folgte nach einem Jahr eine zweite KMT, wodurch wieder eine akute GvHD ausgelöst wurde, deren max. Grad I war. Der Patient hat an der Stelle -376 des TNF- α -Promotors den Genotypus G/A im Gegensatz zu allen anderen Patienten, bei denen der Genotypus G/G an dieser Position vorkommt.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
25	m	37	AML	ja	CSA 3mg/kg KG ab d -1, Cortison 2mg/kg KG ab d +18, Antithymoglobulin

max.Grad	T-D	-308	-238
II	HLA-ident., fremd	G/G	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA
26	m	54	AML	ja

max.Grad	T-D	-308	-238
II	?	G/G	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
28	m	39	CML	ja	CSA, Methotrexat

max.Grad	T-D	-308	-238
II	?	G/G	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
33	m	50	CML	ja	CSA 3mg/kg KG ab d -1, Antithymoglobulin, CD34 ⁺ Selection, Corticosteroide

max.Grad	T-D	-308	-238
II	HLA-ident., sibling	G/G	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
34	w	62	Plasm	ja	CSA 3mg/kg KG ab d 0, Antithymoglobulin

max.Grad	T-D	-308	-238
II	HLA-ident., fremd	G/G	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
35	w	56	AML	ja	CSA ab d -1, Corticosteroide

max.Grad	T-D	-308	-238
II	HLA-ident., sibling	G/G	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
36	m	53	AML	ja	CSA 3mg/kg KG ab d -1, Decortin H 2mg/kg/d ab d +20, Antithymoglobulin

max.Grad	T-D	-308	-238
II	HLA-ident., sibling	G/A	G/G

Nach der ersten KMT erfolgte keine akute GvHD. Nach der zweiten KMT kam es allerdings zu einer akuten GvHD, deren max. Grad II betrug.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	GvHD-Prophylaxe
42	w	19	CML	CSA 3mg/kg KG ab d -1

max.Grad	T-D	-308	-238
II	HLA-ident., fremd	G/G	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	GvHD-Prophylaxe
44	m	39	MH	CSA 3mg/kg KG ab d 0, Soludecortin 1mg/kg KG ab d +30, Antithymoglobulin

max.Grad	T-D	-308	-238
II	HLA-ident., sibling	G/G	G/G

Die Patientin starb 16 Monate nach KMT am Wiederauftreten ihrer Krankheit.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
46	m	55	AML	ja	CSA 5 mg/kg KG ab d +1, Antilymhozytenglobulin 2,5mg/kg KG an Tagen 4-2

max.Grad	T-D	-308	-238
II	HLA-ident., sibling	G/G	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
3	w	54	NHL	nein	keine

max.Grad	T-D	-308	-238
III	HLA-ident.,verwandt	G/A	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
17	m	54	NHL	nein	Aufgrund kompromittierter Nierenfunktion wurde von einer CSA-Gabe abgesehen.

max.Grad	T-D	-308	-238
III	HLA-ident., sibling	G/G	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
21	m	49	CML	ja	CSA 3mg/kg KG ab d -1

max.Grad	T-D	-308	-238
III	HLA-ident., sibling	G/A	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
30	m	38	CML	ja	CSA 5mg/kg KG ab d -1

max.Grad	T-D	-308	-238
III	HLA-ident., sibling	G/G	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	GvHD-Prophylaxe
41	m	32	ALL	CSA 3mg/kg KG ab d -1, Corticosteroide 3mg/kg KG/d d +27

max.Grad	T-D	-308	-238
III	HLA-ident., sibling	G/G	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
48	m	33	ALL	ja	CSA ab d -1, Kortison ab d +10, Mycophenolatmofetil ab d +21

max.Grad	T-D	-308	-238
III	HLA-ident., sibling	G/G	G/G

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
15	m	50	CML	nein	CSA, Corticosteroide

max.Grad	T-D	-308	-238
IV	HLA-nicht ident., verwandt	G/G	G/G

Der Patient starb 69 Tage nach der KMT an der akuten GvHD.

3.2.2.2 Darstellung der Ergebnisse

Genotypus	Patienten mit akuter GvHD 0. o. I. max. Grades nach allogener SCT		Patienten mit akuter GvHD II., III. o. IV. max. Grades nach allogener SCT	
	n	%	n	%
TNF- α -308				
G/G	12	71	15	71
G/A	5	29	6	29
($\chi^2=0,003$, $p=0,955$)				
TNF- α -238				
G/G	14	82	20	95
G/A	3	18	1	5
($\chi^2=1,656$, $p=0,198$)				

n= Anzahl der untersuchten Patienten

5 der 17 Patienten (29%) mit nach allogener SCT aufgetretener akuter GvHD 0. oder I. max. Grades haben den Genotypus G/A an der Position –308 der TNF- α -Promotor-Region. Bei den restlichen 12 findet sich der Genotypus G/G.

6 der 21 Patienten (29%) mit nach allogener SCT aufgetretener akuter GvHD vom maximalen Grad II, III oder IV haben den Genotypus G/A an der Position – 308 des TNF- α -Promotors. Bei den restlichen 5 ist der Genotypus G/G vorhanden.

Bei 3 der 17 Patienten (18%) mit nach allogener SCT aufgetretener akuter GvHD vom max. Grad 0 oder I ist der Genotypus G/A an der Position –238 vorhanden. Die restlichen 14 haben den Genotypus G/G.

Bei 1 der 21 Patienten (5%) mit nach allogener SCT vorgekommener akuter GvHD vom max. Grad II, III oder IV findet sich der Genotypus G/A. Die anderen

20 haben den Genotypus G/G.

Patienten mit akuter GvHD 0. oder I. max. Grades					
	HLA-ident. sibling	HLA-ident. fremd	HLA-nicht ident. verwandt	HLA-ident (sibling & fremd)	
Genotypus	n=8	n=6	n=1	n=14	%
TNF- α -308					
G/G	4	5	1	9	64
G/A	4	1	0	5	36
TNF- α -238					
G/G	7	4	1	11	79
G/A	1	2	0	3	21

n= Anzahl der untersuchten Patienten

Patienten mit akuter GvHD II., III. oder IV. max. Grades					
	HLA-ident. sibling	HLA-ident. fremd o.verwandt	HLA-nicht ident. verwandt	HLA-ident. (sibling & verwandt)	
Genotypus	n=12	n=6	n=1	n=18	%
TNF- α -308					
G/G	8	4	1	12	67
G/A	4	2	0	6	33
TNF- α -238					
G/G	11	6	1	17	94
G/A	1	0	0	1	6

n= Anzahl der untersuchten Patienten

Genotypus	Patienten mit akuter GvHD 0. o. I. max. Grades nach HLA-ident.allog. SCT		Patienten mit akuter GvHD II., III. oder IV.max. Grades nach HLA-ident.allog. SCT	
	n	%	n	%
TNF-α-308				
G/G	9	64	12	67
G/A	5	36	6	33
($\chi^2=0.020$, $p=0,888$)				
TNF-α-238				
G/G	11	79	17	94
G/A	3	21	1	6
($\chi^2=1,814$, $p=0,178$)				

n= Anzahl der untersuchten Patienten

5 von 14 Patienten (36%) mit nach HLA-ident. allogener SCT aufgetretener akuter GvHD 0. oder I. max. Grades haben den Genotypus G/A an der Position -308 des TNF- α -Promotors vor.

Bei 6 von 18 der Patienten (33%) mit nach HLA-ident. allogener SCT vorgekommener akuter GvHD II.,III. oder IV. max. Grades ist der Genotypus G/A vorhanden.

Bei 3 der 14 Patienten (21%) mit nach HLA-ident. allogener SCT vorgekommener GvHD 0. oder I. max. Grades existiert der Genotypus -238.

Bei 1 der 18 Patienten (6%) mit nach HLA-ident. allogener SCT aufgetretener GvHD II., III. oder IV. max. Grades kommt der Genotypus G/A an der Stelle -238 vor.

Weibliche Patienten nach allogener SCT

Genotypus	Weibliche Patienten mit akuter GvHD 0. o. I. max. Grades nach allogener SCT		Weibliche Patienten mit akuter GvHD II., III. o. IV. max. Grades nach allogener SCT	
	n	%	n	%
TNF-α-308				
G/G	5	50	3	50
G/A	5	50	3	50
($\chi^2=0$, $p=1$)				
TNF-α-238				
G/G	8	80	6	100
G/A	2	20	0	0
($\chi^2=1,371$, $p=0,242$)				

n= Anzahl der untersuchten Patienten

Weibliche Patienten nach HLA-ident. allogener SCT

Genotypus	Weibliche Patienten mit akuter GvHD 0. o. I max. Grades nach HLA-ident. allog. SCT		Weibliche Patienten mit akuter GvHD II., III. o. IV. max. Grades nach HLA-ident. allog. SCT	
	n	%	n	%
TNF-α-308				
G/G	4	44	3	50
G/A	5	56	3	50
($\chi^2=0,045$, $p=0,833$)				
TNF-α-238				
G/G	7	78	6	100
G/A	2	22	0	0
($\chi^2=1,538$, $p=0,215$)				

n= Anzahl der untersuchten Patienten

Männliche Patienten nach allogener SCT				
Männliche Patienten mit akuter GvHD 0. o. I. max. Grades nach allogener SCT			Männliche Patienten mit akuter GvHD II., III. o. IV. max. Grades nach allogener SCT	
Genotypus	n	%	n	%
TNF- α -308				
G/G	7	100	12	80
G/A	0	0	3	20
			(x ² =1,621, p=0,203)	
TNF- α -238				
G/G	6	86	14	93
G/A	1	14	1	7
			(x ² =0,335, p=0,563)	

n= Anzahl der untersuchten Patienten

Männliche Patienten nach HLA-ident. allogener SCT				
Männliche Patienten mit akuter GvHD 0. O. I. max. Grades nach HLA-ident. allog. SCT			Männliche Patienten mit akuter GvHD II., III. o. IV. max. Grades nach HLA-ident. allog. SCT	
Genotypus	n	%	n	%
TNF- α -308				
G/G	5	100	9	75
G/A	0	0	3	25
			(x ² =1,518, p=0,218)	
TNF- α -238				
G/G	4	80	11	92
G/A	1	20	1	8
			(x ² =0,463, p=496)	

n= Anzahl der untersuchten Patienten

an ALL erkrankte Patienten nach allogener SCT				
an ALL erkrankte Patienten mit akuter GvHD 0. o. I. max. Grades nach allog. SCT			an ALL erkrankte Patienten mit akuter GvHD II.,III. o. IV. max. Grades nach allog. SCT	
Genotypus	n	%	n	%
TNF- α -308				
G/G	4	100	2	100
G/A	0	0	0	0
(keine statistischen Ergebnisse beim χ^2 -Test/Genotypus=Konstante)				
TNF- α -238				
G/G	3	75	2	100
G/A	1	25	0	0
($\chi^2=0,600$, $p=0,439$)				
n= Anzahl der untersuchten Patienten				

an AML erkrankte Patienten nach allogener SCT				
an AML erkrankte Patienten mit akuter GvHD 0. o. I. max. Grades nach allog. SCT			an AML erkrankte Patienten mit akuter GvHD II.,III. o. IV. max. Grades nach allog. SCT	
Genotypus	n	%	n	%
TNF- α -308				
G/G	5	62,5	5	71
G/A	3	37,5	2	29
($\chi^2=0,134$, $p=0,714$)				
TNF- α -238				
G/G	6	75	6	86
G/A	2	25	1	14
($\chi^2=0,268$, $p=0,605$)				
n= Anzahl der untersuchten Patienten				

an CML erkrankte Patienten nach allogener SCT				
an CML erkrankte Patienten mit akuter GvHD 0. o. I. max. Grades nach allog. SCT			an CML erkrankte Patienten mit akuter GvHD II., III. o. IV. max. Grades nach allog. SCT	
Genotypus	n	%	n	%
TNF- α -308				
G/G	2	100	5	62,5
G/A	0	0	3	37,5
($\chi^2=1,071$, $p=0,301$)				
TNF- α -238				
G/G	2	100	8	100
G/A	0	0	0	0
(keine statistischen Ergebnisse beim χ^2 -Test/Genotypus=Konstante)				
n= Anzahl der untersuchten Patienten				

3.2.3 INF- γ -Promotor-Region

3.2.3.1 IFN- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen –1064 und –685

Die Promotor-Region von IFN- γ zwischen den Positionen –1064 und –685 wurde bei insgesamt 30 Patienten auf den Auftritt einer akuten GvHD nach allogener SCT untersucht.

13 der 30 Patienten entwickelten eine akute GvHD 0. oder I. max. Grades.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
40	f	20	MdS	ja	Thymoglobulin 3,5mg/kg KG an d -5, -3 bis -1

max.Grad	T-D
0	HLA-nicht ident., verwandt

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	GvHD-Prophylaxe
50	w	45	CML	CSA ab d -1, Corticosteroide, Antithymoglobulin

max.Grad	T-D
I	HLA-nicht ident., verwandt

Bei den Patienten 40, 12, 31, 37, 50, 1, 4, 5, 14, 16, 43 und 47 kommt an der Position -765 des IFN- γ -Promotors der Genotypus C/C vor. Bei dem an akuter GvHD I. max. Grades erkrankten Patienten 45 ist an dieser Position der Genotypus C/G vorhanden.

17 der 30 Patienten erkrankten an einer GvHD II., III. oder IV. max. Grades.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
39	m	23	ALL	ja	CSA 3mg/kg KG ab d-1, Cortison 1mg/kg KG ab d +11, gesteigert auf 3mg/kg KG am d +12

max.Grad	T-D
II	HLA-nicht ident., verwandt

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	CMV-PI oder RA	GvHD-Prophylaxe
49	m	41	AML		CSA ab Tag -1

max.Grad	T-D
III	HLA-ident., sibling

Bei den Patienten 11, 13, 25, 26, 34, 35, 36, 39, 42, 44, 3, 15, 17, 30, 41, 48 und 49 finden sich in diesem Bereich der IFN- γ -Promotor-Region keine Punktmutationen.

3.2.3.2 IFN- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen –704 und -375

Die Promotor-Region von IFN- γ zwischen den Positionen –704 und –375 wurde bei insgesamt 23 Patienten auf den Auftritt einer akuten GvHD nach allogener SCT untersucht.

Bei 9 der 23 Patienten (Patienten 12, 31, 37, 1, 4, 5, 14,16, und 43) kam eine akute GvHD 0. oder I. max. Grades vor.

14 der 23 Patienten (Patienten 8, 11, 13, 34, 35, 36, 42, 44, 3, 15, 17, 30, 41 und 48) trat eine akute GvHD II., III. oder IV. max. Grades auf.

3.2.3.3 IFN- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen –394 und +35

Die Promotor-Region von IFN- γ zwischen den Positionen –394 und +35 wurde bei insgesamt 26 Patienten auf den Auftritt einer akuten GvHD nach allogener SCT untersucht.

10 der 26 Patienten (Patienten 12, 31, 37, 40, 4, 5, 14, 16, 43 und 50) hatten eine akute GvHD 0. oder I. max. Grades.

16 der 25 Patienten (Patienten 8, 11, 13, 25, 26, 34, 35, 36, 42, 44, 3, 15, 17, 30, 41 und 49) entwickelten eine akute GvHD II., III. oder IV. max. Grades.

3.3 Chronische GvHD

3.3.1 TNF- α -Promotor-Region

Die TNF- α -Promotor-Region wurde bei insgesamt 15 Patienten auf den Auftritt einer chronischen GvHD, die 100 Tage oder später nach allogener SCT vorkommt, untersucht.

4 der 15 Patienten entwickelten eine chronische GvHD vom niedrigen oder mäßigen Grad.

Patient	11	12	27	46
-308	G/G	G/G	G/G	G/G
-238	G/G	G/G	G/G	G/G

Der Genotypus G/A kommt weder an der Position –308 noch an der Position –238 vor.

11 der 15 Patienten erkrankten an einer schweren chronischen GvHD.

Patient	1	4	8	13	25	28	30	34	41	42	48
-308	G/A	G/G	G/A	G/A	G/G						
-238	G/G	G/A	G/G	G/A	G/G						

Bei 3 der 11 Patienten kommt der Genotypus G/A an der Position –308 der TNF- α -Promotor-Region vor. Die restlichen haben den Genotypus G/G.

Bei 2 von den 11 Patienten ist der Genotypus G/A an der Position –238 der TNF- α -Promotor-Region vorhanden. Die restlichen haben den Genotypus G/G.

Patienten mit chronischer GvHD nach allogener SCT

Genotypus	Patienten mit niedriger oder mäßiger chron. GvHD		Patienten mit schwerer chron. GvHD	
	n	%	n	%
TNF-α-308				
G/G	4	100	8	73
G/A	0	0	3	27
($\chi^2=1,364$, $p=0,243$)				
TNF-α-238				
G/G	4	100	9	82
G/A	0	0	2	18
($\chi^2=0,839$, $p=0,360$)				

n= Anzahl der untersuchten Patienten

3.3.2 IFN- γ

Es wurde die IFN- γ -Promotor-Region von den folgenden Patienten auf den Auftritt einer chronischen GvHD untersucht.

Patient	11	12	39	1	4	8	13
chron.GvHD/ niedrig, mäßig	ja	ja	ja	-	-	-	-
chron.GvHD/ schwer	-	-	-	ja	ja	ja	ja
Punktmutationen im IFN- γ -Promotor zw. -1064 & -685	-	-	-	-	-	n.u.	-
Punktmutationen im IFN- γ -Promotor zw. -704 & -375	-	-	n.u.	-	-	-	-
Punktmutationen im IFN- γ -Promotor zw. -394 & +35	-	-	n.u.	n.u.	-	-	-

Patient	25	30	34	42	49	50	41
chron.GvHD/ niedrig, mäßig	-	-	-	-	-	-	-
chron.GvHD/ schwer	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
Punktmutationen im IFN- γ -Promotor zw. -1064 & -685	-	-	-	-	-	-	-
Punktmutationen im IFN- γ -Promotor zw. -704 & -375	n.u.	-	-	-	n.u.	n.u.	-
Punktmutationen im IFN- γ -Promotor zw. -394 & +35	-	-	-	-	-	-	-

Patient	48
chron.GvHD/ niedrig,mäßig	-
chron.GvHD/ schwer	ja
Punktmutationen im IFN- γ -Promotor zw. -1064 & -685	-
Punktmutationen im IFN- γ -Promotor zw. -704 & -375	-
Punktmutationen im IFN- γ -Promotor zw. -394 & +35	n.u.

Keine Punktmutationen finden sich bei diesen Patienten in der IFN- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen -1064 und +35.

4 Diskussion

4.1 Polymorphismus im Genom

Für die Individualität jedes Menschen sind Unterschiede von ungefähr 3 Mio. Basenpaaren (0,1% des Genoms) im humanen Genom zuständig [125]. Diese im Laufe der Generationen hervorgerufene Unterschiede entstehen durch Mutationen und werden, wenn das häufigste Allel eine Frequenz von weniger als 0.99 hat, als Polymorphismen bezeichnet [1,125]. Sie tragen nicht nur zur Entstehung der Individualität bei, sondern auch zur Entstehung von Erkrankungen.

Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphisms (SNPs)) sind die häufigste DNA-Sequenzvariation des menschlichen Genoms. Etwa 90% der genetischen Unterschiede zwischen zwei Individuen werden durch SNPs ausgemacht. Die Existenz eines SNP in einem klar definierten DNA-Abschnitt wird als genetischer Marker betrachtet, dessen Vererbung von Generation zu Generation verfolgt werden kann [125]. Generell können Mutationen als eine treibende Kraft der Evolution dargestellt werden, weil durch mutative Ereignisse immer wieder neue Varianten eines Merkmals entstehen können, die dann der Selektion unterliegen [5]. Die DNA-Polymorphismen können in vier Kategorien eingeteilt werden: (1) Solche, ohne phänotypische Wirkung (z. B. DNA-Polymorphismen, die für die Personenidentitätstestung nützlich sind), (2) solche, die zu phänotypischen Unterschieden, aber nicht zu Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Krankheiten führen (z. B. Unterschiede in Körperhöhe und Haarfarbe), (3) solche, die Krankheitsauftreten und Verlauf in geringem oder moderatem Maß beeinflussen können (z. B. für komplexe Krankheitsmerkmale) und (4) solche, die einen großen Einfluss auf die Entstehung eines Krankheitsphänotyps haben [1].

4.2 Punktmutationen im Genom

Die Einzelnukleotid-Polymorphismen werden durch Punktmutationen hervorgerufen, bei denen der Defekt auf submikroskopischer Ebene liegt [125]. Bei den Punktmutationen kommt es zum Austausch, Substitution oder Deletion einzelner DNA-Basen [1,125,126]. Wenn in der kodierenden Region zum Ersatz einer Base durch eine andere kommt, können die herausgebildeten Punktmutationen drei Effekte verursachen. (1) Sie können synonyme oder stille Mutationen darstellen. Dann führen sie zu keiner Veränderung in der Aminosäuresequenz, sondern nur zu einem anderen Codon für dieselbe Aminosäure. (2) Sie können Missense-Mutationen sein. Dabei kommt es durch den Basenaustausch zur Veränderung der von dem Codon kodierenden Aminosäure. (3) Sie können als Nonsense-Mutationen enden. Dadurch wird ein Codon in ein Stopcodon umgewandelt [1]. Genmutationen können spontan oder induziert entstehen. Spontane Mutationen werden endogen verursacht und treten in allen Zellen wegen der fehleranfälligen DNA-Replikations- und Reparaturmechanismen ständig auf. Induzierte Mutationen kommen vor, wenn Organismen exogen Mutagenen ausgesetzt werden und sind naturgemäß mit höherer Frequenz als Spontanmutationen vorhanden.

Punktmutationen können für Krankheiten verantwortlich sein [125]. Einige Punktmutationen sind relativ alt und können bei Tausenden oder Millionen von Individuen vorkommen, wie das der Fall bei der Sichelzellanämie ist [1]. Die Sichelzellanämie resultiert durch den Austausch von Adenin durch Thymin im Codon 6 der β -Globinkette, der mittels Restriktionsenzymanalyse nachgewiesen werden kann. Durch diese Mutation kommt es an der Oberfläche des Hämoglobins zum Ersatz eines hydrophilen Glutamyrestes durch einen hydrophoben Valylresten. Die Sichelzell-Hämoglobin (HbS) - Moleküle polymerisieren und die Erythrozyten erhalten eine Sichelform [125]. Das gesamte klinische Bild – bestehend aus Störungen wie Anämie, Schmerzkrisen, Nephropathie und Prädisposition für Pneumokokkeninfektionen – ist die physiologische Konsequenz eines einzigen Basenaustausches im Gen [1]. Diese Punktmutation scheint auf der anderen Seite Heterozygoten Schutz vor

schwerer Malaria zu verleihen [125]. Ein weiteres Beispiel einer Erkrankung, deren Punktmutationen zugrunde liegen, ist das Faktor-V-Leiden. Dabei verleiht die Umwandlung von Arginin in Glutamin in der Proteinposition 506 dem Substrat Resistenz gegenüber einer Proteolyse durch aktiviertes Protein c (APC-Resistenz) [1,125]. Beim Prothrombin-Dimorphismus kann es durch die G20210A-Mutation (G-A-Austausch an der Position 20210) zum erhöhten Plasma-Prothrombin-Spiegel kommen und dadurch zu Thrombosen [127]. Bei Patienten mit MELAS-Syndrom (Mitochondriale Encephalomyopathie mit Lactatazidose und Schlaganfällen) wurden auch Punktmutationen im Gen für die Leucin-tRNA beschrieben [125]. Die Analyse des Genoms von Patienten, die am zum zwanghaften Hang zur Selbstzerstörung führenden Lesch-Nyhan-Syndrom leiden, zeigte, dass diese Erkrankung durch Punktmutationen in drei Exons hervorgerufen wird [128]. Der Einfluss von Punktmutationen auf Diabetes mellitus wurde ebenfalls untersucht. Eine Form z. B. des Diabetes mellitus resultiert aus der Punktmutation eines Gens, die die Produktion eines abnormen Insulinmoleküls bewirkt, das wegen einer gestörten Bindung an den Insulinrezeptor unwirksam ist [1]. Die tuberöse Sklerose wird durch Punktmutationen von den TSC1 oder TSC2 Genen der Chromosome 9q33-34 bzw. 16p13 verursacht [129]. Ein Isoleucin-Valin-Polymorphismus, der durch eine A->G-Punktmutation im Exon 7 vom CYP1A1-Gen verursacht wird, könnte auch eine Rolle bei der Entstehung vom Lungenkarzinom spielen [130]. Die Punktmutationen sind mit einer ganzen Reihe von anderen Erkrankungen assoziiert. Die Klärung ihrer Beziehungen mit den Krankheiten ist für die richtige Auswahl und Entwicklung von diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen wichtig.

4.3 Mutationen in Promotoren

Das wichtigste Problem bei der Initiation der Transkription ist das korrekte Auffinden der Startstelle der Transkription, damit es möglichst nur zur Transkription des für die Funktion des betreffenden Gens benötigten DNA-

Abschnitts kommt. Dafür verfügen eukaryote Gene ebenso wie die prokaryoten Gene über Kontrollelemente. Diese befinden sich meistens in DNA-Bereichen, die sich am 5'-Ende, nämlich oberhalb des Startpunktes der Transkription, über mehrere hundert Basen erstrecken und werden als Promotoren oder Promotorregionen bezeichnet. Sie tragen Strukturelemente, die sogenannten cis-Elemente, die die Bindung der RNA-Polymerasen an den Transkriptionspunkt erlauben und Informationen darüber geben, mit welcher Effizienz und zu welchem Zeitpunkt es zur Transkription eines Gens kommt. An diesen cis-Elementen binden sich spezifisch Proteine, die als trans-Elemente bezeichnet werden [125]. Die präzise Sequenz der Basen der Promotorregionen ist wesentlich, da Mutationen die Promotoraktivität beeinflussen können [128]. β -Thalassämien z. B., bei denen es zu Defekten der β -Globinsynthese kommt, können u.a. durch Mutationen in der Promotorregion des β -Globingens entstehen [125].

4.4 TNF- α und IFN- γ

Angesichts der Rolle von TNF- α und IFN- γ als Mediatoren der Immunantwort wurde in dieser Arbeit der Versuch unternommen, nach möglichen Basenveränderungen innerhalb ihrer Promotor-Regionen zu suchen und ihre Beziehung zum Auftritt von CMV-Infektionen und GvH-Erkrankungen zu ermitteln.

4.4.1 TNF- α

4.4.1.1 Polymorphismus im TNF- α -Promotor

Es wurden bei den untersuchten Patienten drei G versus A Polymorphismen an den Positionen -308, -238 und -376 des TNF- α -Promotors gefunden. Diese Polymorphismus-Stellen beeinflussen eventuell die TNF- α -Expression. An der Position -308 ist TNF.308.2 (A an -308) mit einer höheren konstitutiven und

induzierten Produktion vom TNF- α verbunden [45,46,47a,48], während die funktionellen Folgen vom TNF.238.2-Allel (A an -238) nicht ganz klar sind [49a]. Das TNF.238-A-Allel steht im Kopplungsgleichgewicht mit dem TNF.376-A-Allel [78a,120].

Die TNF.308 und 238- und 376-Polymorphismen kommen im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten vor, wobei die Ergebnisse der Studien nicht immer einheitlich sind. Das seltener vorhandene TNF.308.2-Allel könnte mit dem MHC Haplotypus HLA-A1-B8-DR3-DQ2 zusammenhängen [7a,47b] und ist mit einer Reihe von Autoimmunkrankheiten, wie der insulin-abhängige Diabetes-mellitus [50,51] und der systemische Lupus erythematodes [52] assoziiert. Bei der Zöliakie, die aber auch wie der SLE und IDDM mit dem Autoimmunhaplotypus HLA-A1-B8-DR3-DQ2 im Zusammenhang steht, kommt das TNF.308.2-Allel häufiger vor [53,7b,54]. Es könnte sein, dass der zu höherer TNF-Produktion führende -308 TNF.2 Polymorphismus zu der Entwicklung der Autoimmunität beiträgt [55]. Aber hohe Spiegel von TNF- α stehen nicht immer im Zusammenhang mit der Entstehung von Autoimmunkrankheiten. Bei Patienten mit primärer biliärer Zirrhosis [47c] oder bei denen im fortgeschrittener Stadium dieser Erkrankung [56] ist das zu niedriger TNF- α -Produktion führende TNF.308.1-Allel häufiger im Vergleich zu den Kontrollen vorhanden. Das Enthalten von TNF.308.2 ist mit einem schlechterem Verlauf der cerebral-Malaria [57] und der Leishmaniasis [58] verbunden. Beide Krankheiten werden durch sehr hohe Spiegel von TNF- α charakterisiert. Der TNF-308-Polymorphismus könnte auch mit der lepromatösen Lepra [59], der Entwicklung von Langerhans Cell Histiocytosis [67] und bei genetisch definierten Patienten mit der Entstehung von rheumatoider Arthritis [60,118] zusammenhängen. Außerdem kann TNF.308.2 bei der Entstehung von Asthma [62] und atopischen Krankheiten [63] eine Rolle spielen [60]. Das Vorkommen von einem oder zwei TNF.308.2 Allelen bei Spendern von Lebertransplantaten ist mit einem schweren Wiederauftritt von Hepatitis C bei den Empfänger assoziiert [61]. Das A-Allel an der Position -308 im TNF- α -Promotor führt eventuell auch zum erhöhten Risiko für eine schwere Sepsis nach Trauma [64], wobei in einer anderen Studie keine Assoziation

zwischen dem -308 Polymorphismus und den Überlebenschancen einer schweren Sepsis gefunden wurde [65]. Dasselbe Allel kommt einer Studie nach seltener bei Patienten mit oraler submucosa Fibrose im Vergleich zu den Kontrollen vor [66]. Außerdem sind die TNF.308.2-Allele mit einem schlechterem Verlauf vom Non Hodgkin Lymphom verbunden [68]. Die Assoziation zwischen TNF.308 und 238-Polymorphismus und Spondylitis ankylosans wird wie bei vielen anderen Krankheiten kontrovers diskutiert [69,70,71,119]. TNF.238.2, das mit den verlängerten Haplotypen B18, F1C30, DR3 und B57, SC61, DR7 verbunden ist [49b], steht im Zusammenhang mit Tuberkulose [73a] und Malariaanämie [72]. TNF.238.2 ist mit dem nicht-insulin-abhängigen-Diabetes-mellitus [74], der chronischen Hepatitis B [73b] und der chronischen aktiven Hepatitis C [75] assoziiert. Außerdem könnte TNF.238.2 auch ein Risikofaktor für die Osteolysis sein [76]. Auf der anderen Seite könnte der TNF- α -238-G/A Genotypus mit niedriger radiologisch feststellbarer Progression der rheumatoider Arthritis zusammenhängen [77], womit aber andere Studien nicht ganz einverstanden sind [78a]. Der TNF.238 Polymorphismus beeinflusst auch den Verlauf des Plasmozytoms nach Behandlung mit Thalomidin [79]. TNF.308.1 und TNF.238.2 können bei der Entstehung von psoriatischer Arthritis eine Rolle spielen [80,81]. Außerdem könnte der -308A, -238G und TNF- α -2-Haplotypus protektiv gegen die Alzheimer-Krankheit sein [82]. Anderen Studien nach stehen die TNF.238.A und TNF.376-A-Allele mit der schweren Silicosis [120] und das TNF.376-A-Allel mit der multiplen Sclerosis in Verbindung [121].

Die Expression von -308 und -238-Polymorphismen ist von den verschiedenen Stimuli und Zelltypen abhängig [55b,49a,83,78b].

Die Häufigkeit der TNF-308, -238 und -376-Allele variiert auch zwischen den verschiedenen gesunden Populationen [84,85,86,87,88,115].

4.4.1.2 Antivirale Eigenschaften vom TNF- α

Zu den Effekten vom TNF- α gehört u.a. die antivirale Aktivität. Wie die

Interferone kann TNF- α seine antiviralen Effekte sowohl direkt auf die Zellen ausüben als auch indirekt durch das Immunsystem. TNF- α hat nicht nur einen prophylaktischen Wert, indem er nicht-infizierte Zellen vor viralen Infektionen schützt, sondern auch eine zytotoxische Rolle durch die selektive Eliminierung von mit dem Virus infizierten Zellen.

Virale Infektionen, die bekanntlich Interferone induzieren, lösen auch die Produktion vom TNF- α aus. Infektionen mit RNA oder DNA-Viren, wie das Encephalomyokarditisvirus, New castle disease virus, vesicular-stomatitis Virus, Sendai virus, Adenovirus-2, Herpes-simplex-virus oder Zytomegalovirus können schnell die Produktion vom TNF- α hervorrufen.

TNF- α aktiviert die Expression von verschiedenen Genen bei vielen Zelltypen. Die meisten der bekannten TNF-induzierten Proteine tragen wahrscheinlich nicht zu der antiviralen Aktivität bei. Trotzdem gibt es drei Proteine, die eventuell mit der antiviralen Aktivität vom TNF- α zusammenhängen: 2-5-A-Synthetase, IFN- β und IL-6 [124].

2-5-A-Synthetase ist ein Enzym, das die Polymerisierung von Adennucleotiden zu 2-5-Oligoadenylsäure katalysiert. Diese Oligonukleotide führen zur Aktivierung von Ribonukleasen, die dann die virale mRNA abbauen können [10b]. So werden die Zellen vor viralen RNA-Infektionen geschützt. Ob 2-5-A-Synthetase eine essentielle Komponente des TNF- α -induzierten antiviralen Effekts ist, muss aber weiter untersucht werden.

Die antivirale Aktivität vom TNF- α könnte auch durch die Produktion von IFN- β und/oder IL-6 vermittelt werden [124]. IFN- β induziert die 2-5-A-Synthetase, die Proteinkinase und die Klasse-I-MHC-Molekülen. Außerdem stimuliert es die B-Zell-Differenzierung und aktiviert die zytotoxischen T-Lymphozyten und die Killer-Zellen. IL-6 weist ebenfalls eine schützende Wirkung vor Viren auf [10b]. Trotzdem zeigen viele Beobachtungen, dass weder IFN- β noch IL-6 der einzige Mediator der antiviralen Aktivität sein kann.

Der bemerkenswerteste protektive Effekt vom TNF- α gegen Viren tritt in Anwesenheit vom IFN- γ auf. Bei manchen virus-infizierten Zellen zeigt weder TNF- α noch IFN- γ allein feststellbare antivirale Aktivität. Wenn aber beide Zytokine benutzt werden, kommen erstaunliche antivirale Wirkungen vor. Dieser

Synergismus ist bei allen untersuchten Zellkulturen und Viren vorhanden. Diese synergistische Interaktion deutet darauf hin, dass die zwei Zytokine getrennte pathophysiologische Wege für die Induktion von antiviralen Abwehrmechanismen benutzen. Wenn beide pathophysiologische Wege aktiviert werden, ist die antivirale Reaktion der Zellen viel effektiver.

Außerdem nimmt TNF- α auch durch die selektive Eliminierung von virus-infizierten Zellen an der antiviralen Abwehr teil. Durch diese frühzeitige Lyse von infizierten Zellen nimmt die Produktion von ausgereiften Virusteilen wahrscheinlich ab. Die selektive TNF- α -vermittelte Zytotoxizität könnte durch die Unfähigkeit der virus-infizierten Zellen zustande kommen, protektive Proteine zu synthetisieren. TNF- α könnte auch eventuell indirekt zu der antiviralen Abwehr beitragen, indem er die Anerkennung der infizierten Zellen von den zytotoxischen T-Zellen erleichtert. TNF- α induziert nämlich die virale Antigenexpression von manchen Virusarten, was aber auch von anderen Zytokinen verursacht werden kann [124].

4.4.1.3 CMV-Infektion

Bei angeborener oder krankheitsbedingter Immundefizienz sowie iatrogener Immunsuppression ist CMV einer der klinisch wichtigsten opportunistischen Erreger. Häufige klinische Erscheinungen sind die interstitielle Pneumonie, die Retinitis und die ulzerativen Enterokolitiden, die zu einer Verschlechterung der Grundkrankheit führen können. Bei stammzelltransplantierten Patienten können durch primäre oder Reaktivierungsinfektionen schwere Komplikationen auftreten [5b]. Seit der Verwendung sensitiver Testverfahren, wie die CMV-Anzüchtung in Blut, Urin und Rachenspülwasser oder der Antigentest in peripheren Leukozyten und die PCR [15] und dem Einsatz wirksamer Medikamente könnte die Mortalität der CMV-Erkrankung nach SCT deutlich gesenkt werden. Trotz der Verbesserungen in diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen stellt die CMV-Infektion und insbesondere die CMV-interstitielle Pneumonie bei abwehrgeschwächten Patienten eine

bedrohliche Komplikation dar, da die Erkrankung oft einen letalen Ausgang hat [16].

Das CMV ist ubiquitär verbreitet. Die Durchseuchung ist u.a. von klimatischen und hygienischen Verhältnissen abhängig [5b]. In Finnland haben Hurme M. und Helminen M. den Zusammenhang zwischen CMV-Seropositivität und dem TNF-Promotor-Polymorphismus an der Position -308 untersucht [17]. TNF.308.2 kam in Kombination mit dem IL-1 receptor antagonist allele 2 bei den gesunden CMV-seronegativen Menschen signifikant häufiger vor als bei den gesunden CMV-seropositiven Leuten. Deshalb wurde es vermutet, dass das 308-A-Allel der Promotor-Region des TNF- α , der mit starken inflammatorischen Reaktionen assoziiert ist, eine protective Rolle gegen CMV-Infektion haben kann [17].

Das -308-A-Allel der TNF- α -Promotor-Region kommt unter den immunabgeschwächten Patienten in dieser Arbeit leicht häufiger bei den vor der SCT CMV-seronegativen Patienten (43% vs. 28%, $\chi^2=0,891$, $p=0,345$, $f=1$) und deutlich häufiger bei Patienten ohne nach SCT vorgekommene CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung (41% vs. 20%, $\chi^2=1,973$, $p=0,160$, $f=1$) vor. Die Häufigkeit vom -238-A-Allel ist leicht größer bei den vor SCT CMV-seronegativen Patienten (14% vs. 8%, $\chi^2=0,385$, $p=0,535$, $f=1$) und bei Patienten ohne CMV-Erstinfektion oder Reaktivierung nach SCT (18% vs. 10%, $\chi^2=0,460$, $p=0,498$, $f=1$).

Einer der vor der SCT CMV-seronegativen Patienten, der nicht nach SCT an CMV-Infektion erkrankte, hat den Genotypus G/A an der Position -376. Alle anderen Patienten haben den Genotypus G/G an dieser Stelle. Das TNF.376.A-Allel war wie in der Literatur beschrieben mit dem TNF.238.A-Allel gekoppelt.

Vier der vor SCT CMV-seronegativen Patienten erhielten das Transplantat CMV-seropositiver Spender. Einer von den drei Patienten, die nicht an CMV-Infektion nach der SCT erkrankten, hat den Genotypus G/A an der Position -308 des TNF- α -Promotors. Bei dem vierten an CMV-Infektion erkrankten Patienten kommt der Genotypus G/G an der Stelle -308 vor und im Gegensatz zu den anderen drei Patienten der Genotypus G/A an der Position -238.

Die Erhöhung der TNF- α -Expression könnte theoretisch eine schützende

Wirkung vor CMV-Infektionen haben. Protektive Effekte vom TNF- α gegen Viren wurden diskutiert [8a,10a,124]. TNF- α induziert u.a. die Expression der Klasse I MHC-Moleküle, wodurch die CTL-vermittelte Lyse der mit Viren infizierten Zellen verstärkt wird [8a]. Da die Anzahl der CMV-Infektionen und Reaktivierungen besonders dann zunimmt, wenn die T-lymphozytenmedierte Immunität abgeschwächt wird [1b,13b], dürfte TNF eine bedeutsame Rolle bei der Beherrschung von CMV-Infektionen spielen. TNF- α induziert außerdem IFN- β und IL-6, wodurch die nicht infizierten Zellen vor Infektionen geschützt werden. Zusätzlich schwächt er selektiv die virus-infizierten Zellen und bekämpft somit die Quelle von neuen infektiösen Virusteilen [124]. Die antiviralen Effekte vom TNF- α können mit der Hilfe vom IFN- γ erhöht werden [12b]. Der Synergismus von TNF- α und IFN- γ könnte auch Voraussetzung für die Bekämpfung von DNA-Viren sein [12b]. TNF- α und IFN- γ potenzieren bestimmte Immunreaktionen und können eine bemerkenswerte qualitative und quantitative Zusammenwirkung vorzeigen [124]. Die in dieser Arbeit erhöhte Häufigkeit vom TNF.308.2-Allel bei den vor der SCT CMV-seronegativen Patienten und bei den Patienten ohne nach SCT aufgetretene CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung ist nicht signifikant, so dass dieses zur Erhöhung der TNF- α -Expression führende Allel nicht als protektiver Faktor gegen CMV-Infektionen dargestellt werden kann.

Erwähnenswert ist es auch, dass einer anderen Arbeit nach die Hemmung der TNF- α -Freisetzung oder Aktivität die CMV-assoziierte Morbidität bei allograft-Empfängern vermindern kann. Dieser Studie nach könnte die Beziehung zwischen erhöhten TNF- α -Plasmaspiegeln (besonders nach einer Behandlung mit ATG/OKT3) und dem Vorkommen von CMV-Antigenen in peripheren mononukleären Zellen die wichtige Rolle vom TNF- α bei der Reaktivierung von CMV-Infektionen zeigen. Diese Hypothese wurde von dem Befund unterstützt, dass TNF- α die Aktivierung vom CMV-immediate early-Enhancer/Promotor in den humanen Monozyten stimulieren kann [16a]. Der Mechanismus von dieser TNF- α -vermittelten Aktivierung vom CMV-immediate early-Promotor ist nicht ganz klar. Trotzdem wurde die TNF/TNF-Rezeptor-Interaktion, die eine der stärksten physiologischen Stimuli für den Transkriptionsfaktor NF- κ B darstellt,

gut untersucht. NF- κ B hat eine wichtige regulatorische Funktion bei der Aktivierung von der Transkription von Genen, zu denen auch die Gene vom immediate early-Enhancer gehören [16b].

In einer anderen Studie beschrieben Geist et al, dass die CMV-Infektion die Bindungsaktivität vom NF- κ B verstärkt, der für die Aktivierung vom TNF- α -Promotor nötig ist [122].

4.4.1.4 Transplantationskomplikationen

Nach einer Transplantation kann es u.a. sowohl zur Zerstörung des Transplantates infolge der durch die Immunantwort des Empfängers induzierten Abstoßungsreaktionen kommen, als auch zu Graft-versus-Host-Reaktionen [40]. An den verschiedenen Phasen von GvH und HvG-Reaktionen sind viele Zytokine beteiligt und es ist nicht ganz einfach die produzierten Mengen und die spezifische Rolle von jedem Zytokin zu bestimmen. Trotzdem besteht fast kein Zweifel daran, dass TNF- α eine große Rolle bei diesen Alloreaktionen spielt, denn: (1) sie sind mit einer TNF- α -Überproduktion assoziiert; (2) anti-TNF Antikörper hemmen viele Erscheinungen der akuten Phase sowohl der GvHR als auch der Transplantationsabstoßung; (3) im Gegensatz dazu haben anti-TNF Antikörper einen kleinen oder nicht signifikanten Einfluss auf andere Aspekte der Immunantwort; und (4) die Infusion vom TNF- α kann die meisten der während dieser Alloreaktionen beobachteten Läsionen reproduzieren, wie die Zellnekrose, die vaskuläre Schädigung und die Fibrose [124].

4.4.1.5 Immunpathologisch relevante Eigenschaften vom TNF- α

TNF- α hat eine bemerkenswerte Stelle zwischen den Zytokinen, denn er besitzt die Fähigkeit sowohl die Zellproliferation als auch die Zellnekrose zu induzieren. Diese Ereignisse können im Verlauf der Gewebeschädigung und –remodeling vor, die mit immunpathologischen Reaktionen assoziiert sind. In vitro scheint

TNF- α das Wachstum von Fibroblasten, Astrozyten, Makrophagen und Lymphozyten zu stimulieren. Er soll einen zytotoxischen Effekt auf verschiedene Tumorzelllinien und normale Zellen, besonders Endothelzellen, Oligodendrozyten, thyreoidale epitheliale Zellen und Fibroblasten ausüben. Die Gabe vom TNF- α zu Nagetieren reproduziert die Erscheinungen der Endotoxinämie, besonders den Schock und Tod. Intravenöse Injektion vom Maus-TNF- α zu Mäusen induziert diffuse alveoläre Schädigung mit extensiver Nekrose von endothelialen und epithelialen Zellen. Wenn es als subkutane Infusion verabreicht wird, kann ein weites Spektrum von Reaktionen produziert werden, das von der Dosis und der Dauer der Gabe abhängt. Eine Infusion von 35 ng/Std. 7 Tage lang induziert die Bildung von einer aus Fibroblasten, Kapillaren und Kollagen bestehenden Gewebemasse, die mit einer hyperplastischen Reaktion der Epidermis assoziiert ist. Infusion von 170 ng/Std. für 4 Tage führt zur dermalen Nekrose. Ob dies ein direkter Effekt ist, oder ein Effekt, der durch eine komplizierte Kaskade mit z. B. Leukozytensequestration, endothelialer Schädigung oder intravaskulärer Koagulation vermittelt wird, ist nicht klar. TNF- α und alle Arten von Zellen können sich direkt gegenseitig beeinflussen, aber TNF- α ist auch fähig, indirekt Effekte durch die Induktion von anderen Zytokinen oder Mediatoren wie IL-1, GM-CSF, PDGF, IL-6, IL-8, Prostaglandine oder Zelladhäsionsmoleküle zu verursachen [124].

4.4.1.6 Transplantationsabstoßung

Der zu den proinflammatorischen Zytokinen gehörende TNF- α ist an der Vermittlung von akuten und chronischen Abstoßungen von Transplantaten beteiligt. Plasmaspiegeln von TNF- α sind während akuter Abstoßungsepisoden bei Nieren-, Leber- und Herztransplantationen erhöht [18]. Das zur hohen Produktion von TNF- α führende TNF.308.2-Allel wurde in einer Studie mit einem hohen Risiko für akute Abstoßungsepisoden assoziiert, nur wenn die T-Helfer Lymphozyten der Empfänger der Nierentransplantate durch nicht-identische HLA-Klasse-II Antigene der Spender aktiviert wurden [22]. Da die

Ergebnisse der Studien über die Wirkungen von TNF- α -Polymorphismus auf die Abstoßungsreaktionen sehr unterschiedlich sind, wird es vermutet, dass diese Unterschiede mit den verschiedenen immunsuppressiven Protokollen in Beziehung stehen [24]. Damit dieser Faktor verdrängt wird, wurde der TNF- α -Polymorphismus auch bei nicht exogen immunsupprimierten Patienten untersucht. Bei einer solchen Arbeit wurde keine Verbindung zwischen dem TNF- α -308-Polymorphismus und der durch die Sensibilisierung auftretenden Produktion von HLA-Klasse-I-Alloantikörper, die ein Risikofaktor für die Nierenabstoßungen sind, gefunden [24]. In einer anderen Arbeit wurde ebenfalls keine Beziehung zwischen renal-Abstoßungen und TNF- α -308-Polymorphismus des Empfängers und des Spenders entdeckt, was aber mit anderen Studien nicht vereinbar ist [38]. Pelletier et al beschrieben einen Zusammenhang zwischen dem zur hohen Produktion führenden TNF- α -Polymorphismus und akuter Abstoßung nach Nieren und kombinierten Nieren-Pankreas-Transplantationen [9b]. Sankaran et al fanden eine Korrelation zwischen der Kombination von den zur hohen Produktion führenden TNF- α und IL-10 Genotypen und einer schlechteren Prognose nach Nierentransplantation [93]. Marshall et al berichteten von keiner Assoziation zwischen dem -308 und -238-Polymorphismus des TNF- α -Promotors der Spender [39] oder der Empfänger [41] und dem Auftritt von akuten Abstoßungen nach Nierentransplantationen. Eine signifikante Assoziation zwischen TNF- α -308-Polymorphismus und Leberabstoßung wurde in einer weiteren Arbeit präsentiert [42]. Das TNF-308-A-Allel wurde auch in einer anderen Studie in Verbindung mit Leberabstoßung gebracht [44]. Bathgate et al beschrieben ebenfalls einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen vom TNF.308.2-Allel und der akuten Transplantatabstoßung nach Lebertransplantation. Wenn die akuten Abstoßungen in diejenigen mit einer Episode und diejenigen mit wiederholten Episoden unterteilt wurden, wurde keine Assoziation zwischen dem TNF.308-Genotypus und der Zahl der Abstoßungsepisoden gefunden. Dieser Befund kann andeuten, dass die initiale Erkennung vom Spenderantigen der einzige Einfluss auf die ausreichende TNF- α -Produktion ist [89]. Tambur et al hingegen entdeckten keine Beziehung zwischen dem TNF-308-

Polymorphismus und der Abstoßung nach allogener Lebertransplantation [90]. Weil die Plasmaspiegel von TNF- α im allgemeinen bei herztransplantierten Patienten mit Abstoßungsepisoden im Vergleich zu denen ohne solche Episoden höher sind, wurde der TNF- α -Polymorphismus auch in diesem Zusammenhang untersucht. Es wurde aber von Abdallah et al keine Assoziation festgestellt [91]. Zu dem gleichen Ergebnis kam es auch in einer anderen Studie. Es wurde vermutet, dass die Verwendung von den Immunsuppressiva CSA und Prednisolon, die die 5' Regulation von der TNF- α -Transkription in T-Zellen und Makrophagen unterbrechen, den Einfluß des -308-Polymorphismus hemmte [18]. Auf der anderen Seite wurde in einer weiteren Arbeit eine Assoziation zwischen der Kombination von dem zur hohen TNF- α -Produktion führenden TNF- α -Genotypus (mit dem TNF.308.2-Allele) und dem zur niedrigen IL-10-Produktion führenden IL-10-Genotypus und der frühen Abstoßung nach Herztransplantation beschrieben [92].

Wegen der Erschaffung einer inflammatorischen Umgebung durch TNF- α , wurde erwartet, dass ein zu hoher Zytokin-Produktion führender TNF- α -Promotor-Genotypus das Transplantat weniger empfänglich macht [94]. Es gibt eine ganze Reihe von Untersuchungen darüber, die aber recht unterschiedlich Resultate haben. Es wird angenommen, dass die Ergebnisse von dem Transplantationsorgan und der Behandlung abhängen.

Herz und Lungen z. B. werden als mehr immunogen im Vergleich zu den Nieren angesehen [41]. Die akute Abstoßung nach allogener hepatischer Transplantation muss auch unterschiedlich verlaufen als in anderen Organen. Zu dieser Ansicht trägt auch die Tatsache bei, dass das Finden von HLA-identischen Transplantationspaaren nicht erforderlich ist und eine Episode einer akuten Abstoßung besser verläuft [89]. Deshalb muss es nicht verwunderlich sein, dass der Einfluss eines bestimmten Polymorphismus der Zytokine auf die verschiedenen Organe nicht gleich ist. Es ist vorstellbar, dass die Wirkung von manchen von den Polymorphismen zustandekommen kann, nur wenn das Immunsystem maximal aktiviert wird.

Außerdem ist der Einfluss der immunsuppressiven Therapie auch wichtig, da sie die TNF-Produktion beeinflussen. Der Effekt der Immunsuppression ist nicht

ganz klar. Obwohl die Cyclosporine die TNF-Produktion erniedrigen [95,96,97,117a], können von den Patienten entnommene mit Cyclosporin infundierte mononukleäre Zellen TNF normal produzieren [98]. Im Gegensatz zu Cyclosporin kann Antithymoglobulin die zirkulierenden TNF-Mengen erhöhen [99]. Die Verabreichung von Steroiden kann die Freisetzung von TNF unterdrücken [100,117a]. Die Glucokortikoiden hemmen die TNF- α -Gen-Transkription und Synthese [101]. Durch die gleichzeitige Gabe von Glucokortikoiden und OKT3 bleiben aber die TNF-Spiegel einer anderen Studie nach hoch [79]. Patienten, die mit monoklonalen Antikörpern OKT3 behandelt wurden, hatten niedrigere Spiegel von TNF- α im Vergleich zu denen, die mit CSA behandelt wurde [101]. Der Einfluß der Medikamente auf die TNF-Produktion ist nicht unbedingt sichtbar groß, wenn die TNF-Mengen schon vor der Verabreichung der Immunsuppressiva anders waren und so sich minimal nach der Gabe der Medikamente veränderten [101].

4.4.1.7 GvHD

Eine akute GvHD entwickelt sich bei 35-50% aller Patienten, die HLA-identische Knochenmarktransplantate erhalten haben. Das Risiko steigt mit der Zahl der nicht-passenden HLA-Loci an. Die akute GvHD bricht plötzlich aus, meistens innerhalb der ersten zwei bis drei Wochen nach Transplantation und dauert relativ kurz. Etwa die Hälfte der Patienten, die an mittelschwerer oder schwerer GvHD erkranken, sterben im allgemeinen nicht an der Erkrankung selbst, sondern an unkontrollierten Infektionen, die mit ihr erscheinen [10c]. Die akute GvHD kann in 3 Phasen unterteilt werden. In der ersten Phase sind die Agenzien und v.a. die Ganzkörperbestrahlung und/oder die Chemotherapie, die bei der KMT-Konditionierung eingesetzt werden, wichtige Faktoren für die Ätiologie der akuten GvHD und anderen Transplantationskomplikationen. Die Bestrahlung aktiviert Host-Zellen, damit sie große Mengen von inflammatorischen Zytokinen sezernieren, wie der TNF- α und die IL-1 und -6. Diese können die Endothelzellen schädigen, was zur Aktivierung der T-Zellen

des Spenders beiträgt. Außerdem können die Konditionierungsagenzien zu Schäden u.a. der Mucosa des Gastrointestinaltrakts führen, die später das Gelangen von bakteriellen Produkten, wie das zur Freisetzung von TNF- α und IL-1 aus Makrophagen führende LPS und die Endotoxine, in die Zirkulation ermöglichen. Durch die Zytokine wird die Expression von MHC-Antigenen und Adhäsionsmolekülen erhöht und die Erkennung der Host-MHC und/oder Minor Histocompatibility Antigene von T-Zellen des Spenders nach allogener KMT verstärkt. In der zweiten Phase wird die Spender-T-Zell-Aktivierung durch die Proliferation von Th1 T-Zellen und die Sekretion von IL-2 und IFN- γ charakterisiert. IL-2 und IFN- γ induzieren die Expansion der T-Zellen, die Wirkungen von CTL und NK-Zellen und die Produktion von IL-1 und TNF- α aus mononukleären Phagozyten. Diese Sekretion von TNF- α und IL-1 aus mononukleären Phagozyten (phase 3) wird durch ein sekundäres Signal, wie die LPS, ausgelöst, die durch die während der ersten Phase geschädigte Intestinalmucosa austreten. Solche Toxine können die Lymphozyten und Makrophagen stimulieren und wenn sie das Hautgewebe erreichen, sind sie in der Lage auch die Keratinozyten, die dermalen Fibroblasten und die Makrophagen zu stimulieren, damit sie inflammatorische Zytokine in der Dermis und Epidermis produzieren. Dieser Mechanismus kann die Ausdehnung des lokalen Gewebes Schadens begünstigen und die inflammatorische Antwort fördern. Läsionen in den verschiedenen Geweben sind deutlich mit hohen Mengen von TNF- α und IL-1 assoziiert. Die systemische Wirkung von diesen inflammatorischen Zytokinen induziert u.a. Zellnekrose und Kachexie. Die beiden Zytokine verursachen ein weites Spektrum von schädlichen Wirkungen, die für die akute GvHD charakteristisch sind. Diese Effekte können zusammen mit den CTL und NK zum Gewebeuntergang beim KMT-Host führen. Diese Mechanismen wurden am deutlichsten bei KMT-Modellen bei der Maus dargestellt, aber erste Nachforschungen zeigen, dass sie auch in der klinischen GvHD wichtig sind [103]. Trotz therapeutischer Maßnahmen, die die Suppression der natürlichen Immunreaktionen mit z. B. Methotrexat, Corticosteroiden, Antithymozyten-Globulin, Cyclosporin oder monoklonalen Antikörper und Unterbringung der Patienten in Schutzisolation einschließen,

bleibt die GvHD eine gefürchtete Komplikation [10c].

Eine chronische GvHD findet zwischen 100 Tagen und 18 Monaten nach KMT statt und kommt bei etwa 45% der Langzeit-Überlebenden vor. Der Auftritt ist häufiger bei Patienten, die zuvor schon an einer Episode einer akuten GvHD gelitten haben und Patienten höheren Alters. Die an chronischer GvHD erkrankten Patienten leiden an immunologischen Defekten, die in den meisten Fällen mit der Reduktion der Zahl funktioneller Th- und B-Zellen assoziiert sind. Bei wenigen Patienten endet die chronische GvHD letal und die häufigste Todesursache ist wiederum eine Infektion. Meistens ist sie aber selbstlimitierend [10c].

Der Einfluss des TNF- α -308 und 238-Polymorphismus auf die Entstehung einer GvHD nach SCT wurde auch untersucht. In solchen Arbeiten wurde von Wang et al ein Zusammenhang zwischen dem TNF- α -308-G/A-Genotypus des Spenders und der akuten und chronischen GvHD gefunden, keiner aber zwischen dem TNF- α -238-G/A-Genotypus und der GvHD [104,131]. Takahashi et al beschrieben in einer anderen Studie, dass das von Spendern stammende TNF.308.2-Allel häufiger bei an akuter GvHD III. oder IV. max. Grades Erkrankten vorkam, als bei an GvHD 0. oder I. Grades Erkrankten [132]. Dieses Allel war in dieser Arbeit mit dem HLA-A1-B8-DR3-Haplotypus nicht assoziiert [132]. Couriel et al beschrieben die Effektivität der TNF- α -Blockade für die steroid-refraktäre akute GvHD [106] und in einer anderen Studie wurde eine hohe Produktion vom TNF- α als ein möglicher Voraussagefaktor der akuten GvHD bei knochenmarktansplantierten Patienten dargestellt [105]. Viele Berichte beschäftigten sich mit der Messung vom TNF- α im Serum und seiner Rolle bei der Voraussage der GvHD. Dabei entsteht neben den mit den Messungen der Zytokine im Serum verbundenen Problemen das Problem, dass hohe Spiegel von TNF- α auch mit anderen Komplikationen von Transplantationen verbunden sind, wie die Infektionen und die Venenverschlusskrankheiten [108a]. Bogunia-Kubik et al fanden keine Beziehung zwischen dem TNF- α -308-Promotor-Polymorphismus der Empfänger und der akuten GvHD nach allogener HLA-ident. sibling SCT [107]. Middleton et al fanden keine signifikante Assoziation zwischen dem -308-TNF-

α -Polymorphismus der Empfänger und dem Auftritt von akuten GvHD nach HLA-ident. sibling Knochenmarktransplantationen [108b]. Mayer et al berichteten auf der anderen Seite von einem möglichen Zusammenhang zwischen dem TNF- α -308-Polymorphismus und einer schweren akuten GvHD bei Empfänger von HLA-ident. (sibling und fremden) Knochenmarktransplantaten [109,108b].

In dieser Arbeit hat einer der an GvHD II. max. Grades nach HLA-ident. allogener SCT erkrankten Patienten den Genotypus G/A an der Position -376 des TNF- α -Promotors.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Gruppen von an akuter GvHD erkrankten Patienten gebildet, von denen die eine die an GvHD 0-I max. Grades Erkrankten enthält und die andere die an GvHD II-IV max. Grades Erkrankten einschließt. Die Häufigkeit vom -308-A-Allel des TNF- α -Promotors zeigt keine Assoziation mit dem Grad der akuten GvHD (29% vs. 29%, $\chi^2=0,003$, $p=0,955$, $f=1$). Die Häufigkeit vom TNF-238-A-Allel hingegen nimmt mit steigendem Grad der akuten GvHD ab (18% vs. 5%, $\chi^2=1,656$, $p=0,198$, $f=1$). Keiner der an GvHD III. oder IV. max. Grades erkrankten Patienten hat den Genotypus G/A an der Position -238 und einer der 14 an GvHD II. max. Grades Erkrankten zeigt diesen Genotypus.

TNF- α trägt zu der Entstehung von Entzündungsreaktionen bei und beeinflusst direkt und indirekt den Ausgang der akuten GvHD. Er erhöht u.a. die Expression von MHC-I-Molekülen [8a,9a,12a,98,101] und MHC-II-Molekülen [9a,11a,98] und induziert auch dadurch die Immunantwort, was dem Ausbruch einer akuten GvHD helfen kann. Eine hohe TNF- α -Expression könnte somit den Auftritt einer GvHD begünstigen. Außerdem stimuliert TNF- α die Makrophagen [9a], kann während der ersten Phase der akuten GvHD zu der Schädigung der Endothelzellen beitragen [103] und erhöht die vasculäre Permeabilität [110], wodurch das Gelangen der an der Entstehung der akuten GvHD beteiligten Toxine in die Zirkulation erleichtert wird. TNF- α stimuliert die Freisetzung von IL-1 [101b,111], das in der ersten Phase der akuten GvHD beteiligt ist und spielt eventuell auch eine Rolle bei der Expression von IL-2 und der Induktion von zytotoxischen T-Zellen [101b,111], die u.a. in der dritten Phase zum

Gewebeuntergang beitragen. Zusätzlich kann TNF- α die Expression der Zelladhäsionsmoleküle induzieren, die mit der Zielsuche der Leukozyten assoziiert sind [132] und selber das Gewebe schädigen. Alle diese Funktionen können dazu führen, dass TNF- α eine bedeutsame Rolle in der Pathophysiologie von GvHD spielen kann. Der -238-TNF- α -Promotor-Polymorphismus wurde weniger gut im Vergleich zum -308-TNF- α -Promotor-Polymorphismus untersucht und es ist nicht ganz klar, wie das die TNF- α -Produktion beeinflusst [19a,49a,83,78b]. Kaluza W et al, die die Transkriptionsaktivität und die in vitro TNF- α -Produktion bei an Psoriasis erkrankten Patienten untersuchten, berichteten von einer verminderten Transkriptionsaktivität und Produktion vom TNF- α in Anwesenheit vom TNF.238.2-Allel [83]. Dieser Beobachtung nach könnte der TNF- α -238-G/A-Genotypus einen schützenden Effekt vor der akuten GvHD haben. Große Mengen vom TNF- α hängen nämlich mit der akuten GvHD zusammen. Auf der anderen Seite soll der TNF- α -238-Polymorphismus anderen Studien nach keinen Einfluß auf die TNF- α -Expression haben oder sogar einen kleinen Anstieg verursachen [19a,49a,78b]. Die in dieser Arbeit erniedrigte Häufigkeit vom TNF.238.2-Allel bei den an akuter GvHD II., III. oder IV. max.Grades erkrankten Patienten ist nicht signifikant, so dass dieses Allel nicht als schützender Faktor vor der akuten GvHD betrachtet werden kann.

TNF- α ist auch an der Induktion von chronischer GvHD beteiligt [112]. Das TNF.2-Allel an der Position -308 des TNF- α -Promotors kommt bei keinem der vier Patienten mit niedriger oder mäßiger chronischer GvHD vor. Der Genotypus G/A an der Position -308 ist bei 27% (3/11) der Patienten mit schwerer chronischer GvHD vorhanden ($\chi^2=1,364$, $p=0,243$, $f=1$). Das TNF.2-Allele an der Position -238 des TNF- α -Promotors findet sich bei keinem der vier Erkrankten an niedriger oder mäßiger chronischer GvHD. Der Genotypus G/A an der Position -238 tritt bei 18% (2/11) der Patienten mit schwerer chronischer GvHD auf ($\chi^2=0,839$, $p=0,360$, $f=1$). Die Ergebnisse sind nicht signifikant.

4.4.2 INF- γ

4.4.2.1 CMV-Infektion

Interferon-gamma induziert einen antiviralen Zustand [8b,10b,11b]. Alle Interferone stören die Vermehrung von Viren und weisen antizelluläre Aktivität auf. Die regulatorische Aktivität von IFN- γ ist aber viel stärker als die von IFN- α und IFN- β [10b]. IFN- γ verstärkt die zytotoxische Aktivität von NK Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten, die an der Bestimmung des Auftritts und Verlaufs der CMV-Infektion nach Transplantation beteiligt sind [35,117b]. Außerdem schützt IFN- γ nicht-infizierte Zellen vor viralen Infektionen [35]. Probleme an der Produktion von IFN- γ können zum Anstieg der Morbidität und Mortalität durch Infektionen, wie die CMV-Infektion nach SCT führen [35].

In dieser Arbeit wurde nach Punktmutationen in der Promotor-Region vom IFN- γ gesucht, die die Expression von dem Zytokin und damit auch den Auftritt einer CMV-Infektion beeinflussen können. In den untersuchten IFN- γ -Promotor-Regionen kommen bei den Patienten mit oder ohne CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT und bei den Patienten mit oder ohne CMV-Seropositivität vor der SCT keine Punktmutationen vor.

4.4.2.2 Akute GvHD

IFN- γ gehört zu den proinflammatorischen Zytokinen. Gesteigerte Serumspiegel vom IFN- γ sind mit der akuten GvHD assoziiert und Lymphozyten aus Tieren mit GvHD sezernieren signifikant größere Mengen vom IFN- γ im Vergleich zu Lymphozyten aus Kontrollen ohne GvHD. Zusätzliche Beweise der Rolle vom IFN- γ bei der akuten GvHD sind: Vorbereitung der Makrophagen während der akuten GvHD durch das IFN- γ für die Produktion von inflammatorischen Zytokinen; Induktion der pathologischen Vorgänge im Hautgewebe und Gastrointestinaltrakt mittels IFN- γ ; Vorbeugung der akuten GvHD wenn die CD8⁺ Zellen zur IFN- γ -Produktion unfähig sind; und Verhinderung der akuten

GvHD durch direkte und indirekte Blockade vom IFN- γ [103]. Außerdem fördert es die Expression der MHC-I und II-Moleküle [9a]. Durch diese Funktionen kann das den Auftritt und den Ausgang einer akuten GvHD beeinflussen. Die IFN- γ -Produktion wird wie die von TNF- α durch die Immunsuppressiva beeinflusst [95,102].

In der Promotor-Region vom IFN- γ kommt bei dem an einer akuten GvHD I. max. Grades erkrankten Patienten 45 der Genotypus C/G an der Position -765 vor. In den IFN- γ -Promotoren zwischen den Positionen -1064 und -685 der restlichen 29 Patienten ist der Genotypus C/C an der Position -765 vorhanden. Der C versus G Polymorphismus an der Position -765 des IFN- γ -Promotors flankiert an den Bindungsort vom Transkriptionsfaktor NFAT, der zu der Aktivierung der Transkription der Gene beiträgt. Der NFAT-Bindungsort nimmt an der Regulation der Expression vom IFN- γ in humanen Lymphozyten teil [116].

4.4.2.3 Chronische GvHD

Höhere Produktion von IFN- γ wurde bei Patienten mit chronischer GvHD nach allogener KMT beobachtet [112,113]. In der IFN- γ -Promotor-Region zwischen den Positionen -1064 und +35 befinden sich bei den untersuchten Patienten keine Punktmutationen.

4.5 Zusammenfassung

Allogene stammzelltransplantierte Patienten sind einem höherem Risiko für opportunistische Infektionen ausgesetzt. Dabei spielt CMV eine wichtige Rolle und trägt zur Mortalität nach SCT bei. Eine manifeste CMV-Infektion kann u.a. eine lebensbedrohliche Pneumonie und schwere Kolitis auslösen. Trotz Verbesserungen in Diagnostik und Therapie bleibt die CMV-Infektion und Erkrankung eine gefürchtete Komplikation nach SCT.

Eine herausragende Bedeutung bei Patienten nach allogener SCT hat auch die akute und chronische GvHD. Die Krankheit kann mit verschiedenen klinischen Manifestationen einhergehen und sogar mit dem Tode enden.

Die Zytokine sind Mediatorstoffe der Immunantwort und können deshalb den Auftritt und Verlauf der Erkrankungen beeinflussen. In dieser Arbeit wurde nach Basenveränderungen in den Promotor-Regionen von TNF- α und IFN- γ und nach ihrer Beziehung zu CMV-Infektionen und GvH-Erkrankungen gesucht. Für diesen Zweck wurden DNA-Proben von stammzelltransplantierten Patienten retrospektiv untersucht. Es wurden Polymorphismen an den Positionen -308, -238 und -376 des TNF- α -Promotors und an der Position -765 des IFN- γ -Promotors gefunden, wobei man wegen der kleinen Stichproben vorsichtig mit den Schlussfolgerungen des Einflusses der Polymorphismen sein muss. Eine bewiesene Assoziation der Polymorphismen der Gene der Zytokine mit der CMV-Infektion oder GvHD wäre zweifellos wichtig und könnte als Voraussagefaktor dieser Erkrankungen betrachtet werden. Zusammen mit anderen Faktoren könnte dies die Entwicklung von einem individuellen Risikoindex für diese Krankheiten und den Einsatz einer passenden Therapie erlauben. In dieser Arbeit konnte ein solcher Zusammenhang nicht bewiesen werden.

Der -308-G/A-Genotypus kam häufiger bei den vor SCT CMV-seronegativen Patienten und bei den Patienten ohne CMV-Primärinfektion oder Reaktivierung nach SCT vor. Dieses Ergebnis ist allerdings nicht signifikant und deswegen stellt dieser Genotypus kein schützender Faktor vor der CMV-Infektion dar. Bei den anderen Polymorphismen kam kein großer und kein signifikanter

Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen vor.

Die Häufigkeit des –238-G/A-Genotypus nimmt mit steigendem Grad der akuten GvHD nach allogener SCT und nach allogener HLA-ident. SCT ab, was aber auch nicht signifikant ist. Somit ist der –238-G/A-Genotypus kein protektiver Faktor gegen die akute GvHD. Die Häufigkeit der anderen Polymorphismen zeigte ebenfalls keine signifikante Assoziation mit dem Grad der akuten GvHD.

5 Literaturverzeichnis

1. Harrisons Innere Medizin, McGraw-Hill, 14. Auflage
1a: pp. 2063-2071
1b: pp. 1298-1303
1c: pp. 869-872
2. Taschenatlas der Biochemie, Koolman J, Röhm K H, 2. Auflage
2a: pp. 370-371
2b: pp. 234-235
3. Bogunia-Kubik K, Suchnicki K, Lange A, HLA-DR11 in addition to donor age, gender, and major blood group incompatibility influence the incidence of acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, Transplant Proc. 2003 Jun; 35(4): 1556-8
4. Socie G, Loiseau P, Tamouza R, Janin A, Busson M, Gluckman E, Charron D, Both genetic and clinical factors predict the development of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem transplantation, Transplantation 2001 Aug 27; 72(4): 699-706
5. Medizinische Mikrobiologie, Brandis H, Köhler W, Eggers H J, Pulverer G, 7. Auflage
5a: p. 239
5b: pp. 780-785
6. Taschenatlas der Immunologie, Burmester G R, Pezzutto A, Thieme-Verlag, p. 266-267
7. Cox A, Duff G W, Cytokines as Genetic Modifying Factors in Immune and Inflammatory Diseases, Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism 1996, 9
7a: p. 131
7b: pp. 129-132
8. Immunologie, Abbas A K, Lichtman A H, Pober J S, Hans Huber Verlag
8a: pp. 296-301
8b: pp. 308-310
8c: pp. 424-427
9. Pelletier R, Pravica V, Perrey C, Xia D, Ferguson R M, Hutchinson I, Orosz C, Evidence for a genetic predisposition towards acute rejection after kidney and simultaneous kidney-

pankreas transplantation, Transplantation, August 27, 2000, 70

9a: p. 674

9b: pp. 674-680

10. Immunologie, Klein J

10a: pp. 253-254

10b: pp. 247-252

10c: pp. 496-499

11. Immunologie, Gemsa D, Kalden J R, Resch K, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart

11a: pp.139-140

11b: pp. 56-57

11c: pp. 85-103

11d: pp. 614-619

12. Immunologie, Roitt I M, Brostoff J, Male D K, 3. Auflage

12a: p.118

12b: pp. 209-210

13. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Hahn, Falke, Kaufmann, Ullmann, 3. Auflage

13a: p. 120

13b: pp. 641-646

14. Immunologie, Janeway C A, Travers P, Spektrum Akademischer Verlag, 2. Auflage, pp.

355-357

15. Hebart H, Müller C, Löffler J, Jahn G, Einsele H, Monitoring of CMV infection: a comparison of PCR from whole blood, plasma PCR, pp65-antigenemia and virus culture in patients after bone marrow transplantation, Bone Marrow Transplantation,1996, 17, 861-868

16. Fietze E, Prösch S, Reinke P, Stein J, Döcke W D, Staffa G, Löning S, Devaux S, Emmrich F, von Baehr R, Krüger D H, Volk H D, Cytomegalovirus infection in transplant recipients. The role of tumor necrosis factor, Transplantation, September 27, 1994, 58

16a: pp. 675-680

16b: p. 679

17. Hurme M, Helminen M, Resistance to human cytomegalovirus infection may be influenced by genetic polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 receptor antagonist genes, Scand J Infect Dis 1998; 30(5): 447-9

18. Turner D M, Grant S C, Lamb W R, Brenchley P E, Dyer P A, Sinnott P J, Hutchinson I V, A genetic marker of high TNF-alpha production in heart transplant recipients, *Transplantation* 1995 Nov 27; 60(10): 1113-7
19. Bayley J P, de Rooij H, van den Elsen P J, Huizinga T W, Verweij C L, Functional analysis of linker-scan mutants spanning the -376, -308, -244, and -238 polymorphic sites of the TNF-alpha promoter, *Cytokine*, 2001 Jun 21; 14(6)
19a: p. 316
19b: pp.316-23
20. Bream J H, Ping A, Zhang X, Winkler C, Young H A, A single nucleotide polymorphism in the proximal IFN-gamma promoter alters control of gene transcription, *Genes Immun* 2002 May; 3(3): 165-9
21. Giedraitis V, He B, Hillert J, Mutation screening of the interferon-gamma gene as a candidate gene for multiple sclerosis, *Eur J Immunogenet* 1999 Aug; 26(4): 257-9
22. Hahn A B, Kasten-Jolly J C, Constantino D M, Graffunder E, Singh T P, Shen G K, Conti D J, TNF-alpha, IL-6, INF-gamma, and IL-10 gene expression polymorphisms and the IL-4 receptor alpha-chain variant Q576R: effects on allograft outcome, *Transplantation* 2001 Aug 27; 72(4): 660-5
23. Ljungman P, Griffiths P, Paya C, Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients, *Clin Infect Dis*, 2002 Apr 15; 34(8): 1094-7
24. Hahn A B, Kasten-Jolly J C, Constantino D M, Graffunder E, Conti D J, Promoter-region alleles of the TNF-alpha and IL-10 genes have no effect on pretransplant alloantibody production, *Transplantation* 2001 Aug 27; 72(4): 739-42
25. Stinski M F, Thomsen D R, Stenberg R M, Goldstein L C, Organisation and expression of the immediate early genes of human cytomegalovirus, *J Virol*, 1983 Apr; 46(1): 1-14
26. Stinski M F, Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus: early and late virus-induced polypeptides, *J Virol*, 1978 Jun; 26(3): 686-701
27. Mocarski E S, Bonyhadi M, Salimi S, McCune J M, Kaneshima H, Human cytomegalovirus in a SCID-hu mouse: thymic epithelial cells are prominent targets of viral replication, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993 Jan 1; 90(1): 104

28. Basiswissen Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Miksits, Hahn, 2. Auflage, Springer Verlag p. 63-65
29. Mlynarczewska A, Wysoczanska B, Karabon L, Bogunia-Kubik K, Lange A, Lack of IFN-gamma 2/2 homozygous genotype independent of recipient age and intensity of conditioning regimen influences the risk of aGVHD manifestation after HLA-matched sibling haematopoietic stem cell transplantation, Bone Marrow Transplant, 2004 Aug; 34(4): 339-44
30. Einsele H, Ehninger G, Steidle M, Fischer I, Böhler S, Gerneth F, Vallbracht A, Schmidt H, Waller H D, Müller C A, Lymphocytopenia as an unfavorable prognostic factor in patients with cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation, Blood, 1993 Sep 1; 82(5): 1672-8
31. Riddell S R, Pathogenesis of cytomegalovirus pneumonia in immunocompromised hosts, Semin Respir Infect, 1995 Dec; 10(4): 199-208
32. Reusser P, Attenhofer R, Hebart H, Helg C, Chapuis B, Einsele H, Cytomegalovirus-specific T-cell immunity in recipients of autologous peripheral blood stem cell or bone marrow transplantats, Blood, 1997 May 15; 89(10): 3873-9
33. Meyers J D, Flournoy N, Thomas E D, Risk factors for cytomegalovirusinfectionafter human marrow transplantation, J Infect Dis, 1986 Mar, 153(3): 478-88
34. Praktische Aspekte der supportiven Therapie in Hämatologie und Onkologie, Bokemeyer C, Lipp H P, Springer Verlag, p. 23-43
35. Bowden R A, Dobbs S, Amos D, Meyers J D, Comparison of interleukin 2 und gamma-interferon production by peripheral blood mononuclear cells in response to cytomegalovirus after marrow transplantation, Transplantation, July 1990, 50, 38
36. Miller W J, Mcculloch J, Balfour H H, Haake R J, Ramsay N K C, Goldman A, Prevention of cytomegalovirus infection following bone marrow transplantation: a randomized trial of blood product screening, Bone Marrow Transplantation, 7, 227-234, 1991
37. Bowden R A, Slichter S J, Kayers M, Weisdorf D, Cays M, Schoch G, Banaji M, Haake R, Welk K, Fisher L, et al, A comparison of filtered leukocyte-reduced and cytomegalovirus (CMV) seronegative blood products for the prevention of transfusion-associated CMV

- infection after marrow transplant, *Blood*, 1995 Nov 1, 86(9): 3598-603
38. Poole K L, Gibbs P J, Evans P R, Sadek S A, Howell W M, Influence of patient and donor cytokine genotypes on renal allograft rejection: evidence from a single centre study, *Transpl Immunol* 2001 Feb; 8(4): 259-65
 39. Marshall S E, McLaren A J, Mckinney E F, Bird T G, Haldar N A, Bunce M, Morris P J, Welsh K I, Donor cytokine genotype influences the development of acute rejection after renal transplantation, *Transplantation*, February 15, 2001, 71, 469-476
 40. Checkliste Immunologie, Baenkler H W, pp. 174-176
 41. Marshall S A, McLaren A J, Haldar N A, Bunce M, Morris P J, Welsh K I, The impact of recipient cytokine genotype on acute rejection after renal transplantation, *Transplantation*, November 27, 2000, 70, 1485-1491
 42. Jonsson J R, Hong C, Purdie D M, Hawley C, Isbel N, Butler M, Balderson G A, Clouston A D, Pandeya N, Stuart K, Edwards-Smith C, Crawford D H, Fawcett J, Powell E E, Role of cytokine gene polymorphisms in acute rejection and renal impairment after liver transplantation, *Liver Transpl* 2001 Mar; 7(3): 255-63
 43. Labor und Diagnose, Thomas L, 5. Auflage, TH Books, p. 1262-1263 und 1488-1489
 44. Fernandes H, Koneru B, Fernandes N, Hameed M, Cohen M C, Raveche E, Cohen S, Investigation of promoter polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genes in liver transplant patients, *Transplantation* 2002 Jun 27; 73(12): 1886-91
 45. Wilson A G, Symons J A, Mc Dowell T L, McDevitt H O, Duff G W, Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor-alpha promoter on transcriptional activity, *Proc Natl Acad USA*, 1997 Apr 1; 94(7): 3195-9
 46. Clay F E, Cork M J, Wilson A G, Crane A M, Lewis F, Harrington C I, Duff G W, Promoter region polymorphism in the human TNF-alpha gene is not associated with lichen sclerosis, *Exp Dermatol*, 1996 Aug; 5(4): 227-9
 47. Melita A G, Oppenheim E, Camp N J, di Giovine F S, Duff G W, Gleeson D, Primary biliary cirrhosis shows association with genetic polymorphism of tumour necrosis alpha promoter region, *Journal of Hepatology* 1999,31
47a: p. 242

47b: p. 245

47c: pp. 242-247

48. Densem C G, Hutchinson I V, Yonan N, Brooks N H, Influence of tumor necrosis factor-alpha gene-308 polymorphism on the development of coronary vasculopathy after cardiac transplantation, *J Heart Lung Transplant* 2001 Dec; 20(12): 1265-73

49. Pociot F, D'Alfonso S, Compasso S, Scorza R, Richiardi P M, Functional analysis of a new polymorphism in the human TNF alpha gene promoter, *Scand J Immunol*, 1995 Oct; 42(4)
49a: pp. 501-4
49b: p. 501

50. Pociot F, Briant L, Jongeneel C V, Mölvig J, Worsaae H, Abbal M, Thomsen M, Nerup J, Cambon-Thomsen A, Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF- α and TNF- β by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus, *Eur J Immunol*, 1993, 23: 224-231

51. Cox A, Gonzalez A M, Wilson A G, Wilson R M, Ward J D, Artlett C M, Welsh K, Duff G W, Comparative analysis of the genetic associations of HLA-DR3 and tumour necrosis factor alpha with human IDDM, *Diabetologia*, 1994 May; 37(5): 500-3

52. Wilson A G, Gordon C, di Giovine F S, de Vries N, van de Putte L B A, Emery P, Duff G W, A genetic association between systemic lupus erythematosus and tumor necrosis factor alpha, *Eur J Immunol*, 1994, 24: 191-195

53. De la Concha E G, Fernandez-Arquero M, Vigil P, Rubio A, Maluenda C, Polanco I, Fernandez C, Figueredo M A, Celiac disease and TNF promoter polymorphisms, *Hum-Immunol*, 2000 May; 61(5): 513-7

54. McManus R, Wilson A G, Mansfield J, Weir D G, Duff G W, Kelleher D, TNF2, a polymorphism of the tumour-necrosis- α gene promoter, is a component of the celiac disease major histocompatibility complex haplotype, *Eur J Immunol*, 1996, 26: 2113-2118

55. Kroeger K M, Steer J H, Joyce D A, Lawrence J A, Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumour necrosis factor promoter polymorphism, *Cytokine*, 12, February 2000
55a: p. 110
55b: pp. 110-119

56. Jones D E, Watt F E, Grove J, Newton J L, Daly A K, Gregory W L, Day C P, James O F, Bassendine M F, Tumour necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in primary biliary cirrhosis, *J Hepatol* 1999 Feb; 30(2): 232-6
57. McGuire W, Hill A V, Allsopp C E, Greenwood B M, Kwiatkowski D, Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria, *Nature*, 1994 Oct 6; 371(6497): 508-10
58. Cabrera M, Shaw M A, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, Blackwell J M, Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis, *J Exp Med*, 1995 Nov 1; 182(5): 1259-64
59. Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor C G, Saha B, Hazra S K, Hill A V, Kwiatkowski D, Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy, *J Infect Dis*, 1997 Aug; 176(2): 530-2
60. Waldron-Lynch F, Adams C, Amos C, Zhu D K, McDermott M F, Shanahan F, Molloy M G, O'Gara F, Tumour necrosis factor 5' promoter single nucleotide polymorphisms influence susceptibility to rheumatoid arthritis (RA) in immunogenetically defined multiplex RA families, *Genes Immun*, 2001 Apr; 2(2): 82-7
61. Rosen H R, Lentz J J, Rose S L, Rabkin J, Corless C L, Taylor K, Chou S, Donor polymorphism of tumor necrosis factor gene: relationship with variable severity of hepatitis C recurrence after liver transplantation, *Transplantation* 1999 Dec 27; 68(12): 1898-902
62. Moffatt M F, Cookson W O, Tumour necrosis factor haplotypes and asthma, *Hum Mol Genet*, 1997 Apr; 6(4): 551-4
63. Castro J, Telleria J J, Linares P, Blanco-Quiros A, Increased TNFA2, but not TNFB1, allele frequency in Spanish atopic patients, *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2000 May Jun; 10(3): 149-54
64. O'Keefe G E, Hybki D L, Munford R S, The G→A single nucleotide polymorphism at the -308 position in the tumor necrosis factor-alpha promoter increases the risk for severe sepsis after trauma, *J Trauma* 2002 May; 52(5): 817-25
65. Stuber F, Udalova I A, Book M, Drutskaya L N, Kuprash D V, Turetskaya R L, Schade F U, Nedospasov S A, -308 tumor necrosis factor (TNF) polymorphism is not associated with

survival in severe sepsis and is unrelated to lipopolysaccharide inducibility of the human TNF promoter, *J Inflamm*, 1995-96; 46(1): 42-50

66. Chiu C J, Chiang C P, Chang M L, Chen H M, Hahn L J, Hsieh L L, Kuo Y S, Chen C J, Association between genetic polymorphism of tumor necrosis factor-alpha and risk of oral submucous fibrosis, a pre-cancerous condition of oral cancer, *Journal of dental research*, 2001 Dec; 80(12): 2055-9
67. Wu W S, McClain K L, DN A polymorphisms and mutations of the tumor necrosis factor-a (TNF-a) Promoter in Langerhans Cell Histiocytosis (LCH), *Journal of interferon and cytokine research* 1997, 17: 631-635
68. Warzocha K, Ribeiro P, Bienvenu J, Roy P, Charlot C, Rigal D, Coiffier B, Salles G, Genetic polymorphisms in the tumor necrosis factor locus influence non-Hodgkin's lymphoma outcome, *Blood* 1998 May 15; 91(10): 3574-81
69. Milicic A, Lindheimer F, Laval S, Rudwaleit M, Ackerman H, Wordsworth P, Hohler T, Brown M A, Interethnic studies of TNF polymorphisms confirm the likely presence of second MHC susceptibility locus in ankylosing spondylitis, *Genes Immun*, 2000 Oct; 1(7): 418-22
70. Hohler T, Schaper T, Schneider P M, Meyer zum Buschenfelde K H, Marker-Hermann E, Association of different tumor necrosis factor alpha promoter allele frequencies with ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals, *Arthritis Rheum*, 1998 Aug; 41(8): 1489-92
71. Verjans G M, Brinkman B M, Van Doornik C E, Kijlstra A, Verweij C L, Polymorphism of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) at position -308 in relation to ankylosing spondylitis, *Clin Exp Immunol*, 1994 Jul; 97(1): 45-7
72. McGuire W, Knight J C, Hill A V, Allsopp C E, Greenwood B M, Kwiatkowski D, Severe malarial anemia and cerebral malaria are associated with different tumor necrosis factor promoter alleles, *J Infect Dis*, 1999 Jan; 179(1): 287-90
73. Höhler T, Kruger A, Gerken G, Schneider P M, Meyer zum Büschenfelde K H, Rittner C, A tumour necrosis alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection, *Clin Exp Immunol* 1998; 111
73a: p. 579
73b: pp. 579-582

74. Day C P, Grove J, Daly A K, Stewart M W, Avery P J, Walker M, Tumour necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism and decreased insulin resistance, *Diabetologia*, 1998 Apr; 41(4): 430-4
75. Höhler T, Kruger A, Gerken G, Schneider P M, Meyer zum Buschenfelde K H, Rittner C, Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism at position -238 is associated with chronic active hepatitis C infection, *J Med Virol*, 1998 Mar; 54(3): 173-7
76. Wilkinson J M, Wilson A G, Stockley I, Scott I R, Macdonald D A, Hamer A J, Duff G W, Eastell R, Variation in the TNF gene promoter and risk of osteolysis after total hip arthroplasty, *J Bone Miner Res*, 2003 Nov; 18(11): 1995-2001
77. Brinkman B M, Huizinga T W, Kurban S S, van der Velde E A, Schreuder G M, Hazes J M, Breedveld F C, Verweij C L, Tumour necrosis factor alpha gene polymorphism in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of, disease?, *Br J Rheumatol*, 1997 May; 36(5): 516-21
78. Kaijzel E L, van Krugten M V, Brinkman B M, Huizinga T W, van de Straaten T, Hazes J M, Ziegler-Heitbrock H W, Nedospasov S A, Breedveld F C, Verweij C L, Functional analysis of a human tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism related to joint damage in rheumatoid arthritis, *Mol Med*, 1998 Nov; 4(11)
78a: pp. 724-33
78b: p. 724
79. Neben K, Mytilineos J, Moehler T M, Preiss A, Kraemer A, Ho A D, Opelz G, Goldschmidt H, Polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha gene promoter predict for outcome after thalidomide therapy in relapsed and refractory multiple myeloma, *Blood*, 2002 Sep 15; 100(6): 2263-5
80. Hohler T, Kruger A, Schneider P M, Schopf R E, Knop J, Rittner C, Meyer zum Buschenfelde K H, Marker-Hermann E, A TNF-alpha promoter polymorphism is associated with juvenile onset psoriasis and psoriatic arthritis, *J Invest Dermatol*, 1997 Oct; 109(4): 562.5
81. Hohler T, Grossmann S, Stradmann-Bellinghausen B, Kaluza W, Reuss E, de Vlam K, Veys E, Marker-Hermann E, Differential association of polymorphisms in the TNFalpha region with psoriatic arthritis but not psoriasis, *Ann Rheum Dis*, 2002 Mar; 61(3): 213-8
82. Culpan D, McGowan S H, Ford J M, Nicoll J A, Griffin W S, Dewar D, Cairns N J, Hughes A,

- Kehoe P G, Wilcock G K, Tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms and Alzheimer disease, *Neurosci Lett*, 2003 Oct 16; 350(1): 61-5
83. Kaluza W, Reuss E, Grossmann S, Hug R, Schopof R E, Galle P R, Maerker-Hermann E, Hoehler T, Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238A promoter polymorphism, *J Invest Dermatol*, 2000 Jun; 114(6): 1180-3
84. Wirz S A, Morale M C, Marchetti B, Barr A M, Sotgiu S, Rosati G, Pughiatti M, Sanna M V, Giliberto O, Bartfai T, Conti B, High frequency of TNF alleles -238A and -376A in individuals from northern Sardinia, *Cytokine*, 2004 May 21; 26(4): 149-54
85. Reynard M P, Turner D, Navarrete C V, Allele frequencies of polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha, interleukin-10, interferon-gamma and interleukin-2 genes in a North European Caucasoid group from the UK, *Eur J Immunogenet* 2000 Aug; 27(4): 241-9
86. Vatay A, Yang Y, Chung E K, Zhou B, Blannchong C A, Kovacs M, Karadi I, Fust g, Romics L L, Varga L, Yu C Y, Szalai C, Relationship between complement components C4A and C4B diversities and two TNFA promoter polymorphisms in two healthy Caucasian populations, *Hum Immunol* 2003 May; 64(5): 543-52
87. Schluter B, Erren M, Schotte H, Junker R, Rust S, Assmann G, The mutagenically separated polymerase chain reaction is a rapid and reliable method for genotyping of the tumour necrosis factor-alpha promoter polymorphism (-308 G/A), *Clin Chim Acta* 2002 Jun; 320(1-2): 135-8
88. Park K S, Kim M Y, Mok J W, NcoI restriction fragment length polymorphism at -308 of the tumor necrosis factor alpha (TNFA) promoter region in Korean, *Jpn J Hum Genet*, 1997 Mar; 42(1): 241-7
89. Bathgate A J, Pravica V, Perrey C, Therapondos G, Plevris J N, Hayes P C, Hutchinson I V, The effect of polymorphisms in tumor necrosis factor- α , interleukin-10, and transforming growth factor-b1 genes in acute hepatic allograft rejection, *Transplantation*, 2000 April 15, 69: 1514-1517
90. Tambur A R, Ortegell J W, Ben-Ari Z, Shabtai E, Klein T, Michowiz R, Tur-Kaspa R, Mor E, Role of cytokine gene polymorphism in hepatitis C recurrence and allograft rejection among liver transplant recipients, *Transplantation*, 2001 May 27, 71, 1475-1480

91. Abdallah A N, Cucchi-Mouillot P, Biteau N, Cassaigne A, Haras D, Iron A, Analysis of the polymorphism of the tumour necrosis factor (TNF) gene and promoter and of circulating TNF-alpha levels in heart-transplant patients suffering or not suffering from severe rejection, *Eur J Immunogenet* 1999 Aug; 26(4): 249-55
92. Turner D, Grant S C D, Yonan N, Sheldon S, Dyer P A, Sinnott P J, Hutchinson I V, Cytokine gene polymorphism and heart transplant rejection, *Transplantation*, 1997 September 15, 64: 776-779
93. Sankaran D, Asderakis A, Ashraf S, Roberts I S, Short C D, Dyer P A, Sinnott P J, Hutchinson I V, Cytokine gene polymorphisms predict acute rejection following renal transplantation, *Kidney Int*, 1999 Jul; 56(1): 281-8
94. Agarwal P, Oldenburg M C, Czarneski J E, Morse R M, Hameed M R, Cohen S, Fernandes H, Comparison study for identifying promoter allelic polymorphism in interleukin 10 and tumor necrosis factor alpha genes, *Diagn Mol Pathol* 2000 Sep; 9(3): 158-64
95. McKenna R M, Szturm K, Jeffery J R, Rush D N, Inhibition of cytokine production by cyclosporine A and G, *Transplantation* February 1989, 47: 343-348
96. Nguyen D T, Eskandai M K, DeForge K E, Raiford C L, Strieter R M, Kunkel S L, Remick D G, Cyclosporin a modulation of tumor necrosis factor gene expression and effects in vitro and in vivo, *J Immunol*, 1990 May 15; 144(10): 3822-8
97. Dörge S E, Roux-Lombard P, Dayer J M, Koch K M, Frei U, Lonnemann G, Plasma levels of tumor necrosis factor (TNF) and soluble TNF receptors in kidney transplant recipients, *Transplantation*, November 15, 1994, 58: 1000-1008
98. Dupont E, Schndene L, Denys C, Crusiaux A, Wybran J, Assesment of production of tumor necrosis factor a under the influence of immunosuppressive drugs, *Transplantation Proceedings*, 21,1989 February, pp 70-71
99. Debets J M H, Leunissen M L, van Hooff H J, van der Linden C J, Buurman W A, Evidence of involvement of tumor necrosis factor in adverse reactions during treatment of kidney allograft rejection with antithymocyte globulin, *Transplantation* March 1989, 47: 487-492100.
100. Waage A, Baake O, Glucocorticoids suppress the production of tumour necrosis factor by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes, *Immunology*, 1998 Feb; 63(2): 299-302

101. Imagawa D K, Millis J M, Olthoff K M, Derus L J, Chia D, Sugigh L R, Ozawa M, Dempsey R A, Iwaki Y, Levy P J, Terasaki P I, Busuttil R W, The role of tumor necrosis factor in allograft rejection, *Transplantation*, August 1990, 50
101a: p. 222
101b: p. 224
102. Chatenoud L, Ferran C, Legendre C, Thouard I, Merite S, Reuter A, Gevaert Y, Kreis H, Franchimont P, Bach J F, In vivo cell activation following OKT3 administration, *Transplantation*, April 1990, 49: 697-702
103. Krenger W, Hill G R, Ferrara J L M, Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease, *Transplantation*, August 27, 1997, 64: 553-558
104. Wang J B, Ren H Y, Li D, Sun Q, Lu D P, Frequency of donor TNF-alpha gene polymorphism in patients with graft versus host disease following hematopoietic stem cell transplantation, *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2002 Apr; 10(2): 133-7
105. Dickinson A M, Sviland L, Hamilton P J, Usher P, Taylor P, Jackson G, Dunn J, Proctor S J, Cytokine involvement in predicting clinical graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow transplant recipients, *Bone Marrow Transplantation* 1994, 65-70
106. Couriel D R, Saliba R, Hicks K, Ippoliti C, De Lima M J, Hosing C, Khouri I, Andersson B, Donato M, Gajewski J, Anderlini P, Kontoyannis D P, Cohen A, Martin T, Giralto S, Champlin R, Tumor necrosis factor alpha blockade for the treatment of steroid-refractory acute GvHD, *Blood*, 2004 Apr 6
107. Bogunia-Kubik K, Polak M, Lange A, TNF polymorphisms are associated with toxic but not with aGVHD complications in the recipients of allogeneic sibling haematopoietic stem cell transplantation, *Bone Marrow Transplant*, 2003 Sep; 32(6): 617-22
- 108.. Middleton P G, Taylor P R, Jackson G, Proctor S J, Dickinson A M, Cytokine gene polymorphisms associating with severe acute graft-versus-host disease in HLA-identical sibling transplants, *Blood*, 1998 Nov 15; 92(10)
108a: p. 3946
108b: pp. 3943-8
109. Mayer F R, Messer G, Knabe H, Mempel W, Meurer M, Kolb H J, Holler E, High response of TNF- α secretion in vivo in patients undergoing BMT may be associated with the -308 bp TNF- α -gene enhancer-polymorphism, *Bone Marrow Transplant*. 17: s101, 1996 (abstr)

110. Pober J S, Cotran R S, The role of endothelial cells in inflammation, *Transplantation* October 1990, 50, 537-544
111. Ranges G E, Figari I S, Espevik T, Palladino M A Jr, Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha, *J Exp Med*, 1987 Oct 1; 166(4): 991-8
112. Imamura M, Hashino S, Kobayashi H, Kubayashi S, Hirano S, Minagawa T, Tanaka J, Fujii Y, Kobayashi M, Kasai M, Sakurada K, Miyazaki T, Serum cytokine levels in bone marrow transplantation: synergistic interaction of interleukin-6, interferon-g, and tumor necrosis factor-a in graft-versus-host disease, *Bone Marrow Transplantation*, 1994, 13:745-751
113. Körholz D, Kunst D, Hempel L, Söhngen D, Heyll A, Bönig H, Göbel U, Zintl F, Burdach S, Decreased interleukin 10 and increased interferon-g production in patients with chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation, *Bone Marrow Transplantation*, (1997) 19, 691-695
114. Penix L, Weaver W M, Pang Y, Young H A, Wilson C B, Two essential regulatory elements in the human interferon γ promoter confer activation specific expression in T cells, *The Journal of Experimental Medicine*, 178, November 1993, 1483-1496
115. Lamsis F, Flannery G R, White N G, Muratore R, Kaelan C, Mitchell R J, Alleles and haplotypes of tumor necrosis factor (TNF) alpha and beta genes in three ethnic populations of Sulawesi Indonesia, *Hum Biol*, 2002 Jun; 74(3): 381-96
- 116.. Ackerman H, Udalova I, Hull J, Kwiatkowski D, Evolution of a polymorphic regulatory element in interferon- γ through transposition and mutation, *Molecular Biology and Evolution* 19: 884-890 (2002)
117. *Encyclopedia of Immunology*, Delves P J, Roitt I V, Volume four, second edition
117a: pp. 2435-2440
117b: pp. 1421-1426
118. Yen J H, Chen C J, Tsai W C, Lin C H, Ou T T, Wu C C, Liu H W, Tumor necrosis factor promoter polymorphisms in patients rheumatoid arthritis in Taiwan, *J Rheumatol*, 2001 Aug; 28(8): 1788-92
119. Kaijzel E L, Brinkman B M, van Krugten M V, Smith L, Huizinga T V, Verjans G M,

- Breedveld F C, Verweij C L, Polymorphisms within the tumor necrosis factor alpha promoter region in patients with ankylosing spondylitis, *Hum Immunol*, 1999 Feb; 60(2): 140-4
120. Corbett E L, Mozatto-Chamay N, Butterworth A E, De Cock K M, Williams B G, Churchyard G J, Conway D J, Polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter may predispose to severe silicosis in black South African miners, *Am J Respir Crit Care Med*, 2002 Mar 1; 165(5): 690-3
121. Fernandez-Arquero M, Arroyo R, Rubio A, Martin C, Vigil P, Conejero L, Figueredo M A, de la Concha E G, Primary association of a TNF gene polymorphism with susceptibility to multiple sclerosis, *Neurology*, 1999 Oct 12; 53(6): 1361-3
122. Geist L J, Hopkins H A, Dai L Y, He B, Monick M M, Hunninghake G W, Cytomegalovirus modulates transcription factors necessary for the activation of the tumor necrosis factor-alpha promoter, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997 Jan; 16(1): 31-7
123. Weisdorf D, Hakke R, Blazar B, Miller W, McGlave P, Ramsay N, Kersey J, Filipovich A, Risk factors for acute graft-versus-host disease in histocompatible donor bone marrow transplantation, *Transplantation*, 1991 Jun; 51(6): 1197-203
124. Tumor necrosis factors, The molecules and their emerging role in medicine, Editor: Bruce Beutler, Raven Press
125. Biochemie und Pathobiochemie, Löffler, Petrides, 7. Auflage
126. Microbiology, Bernard D. Davis, Renato Dulbecco, Herman N. Eisen, Harold S. Ginsberg & W. Barry Wood, JR
127. Innere Medizin, Gerd Herold
128. Biochemie, Lubert Stryer, 4. Auflage
129. Walker M, Samii A, Bird T, Coexistenz of tuberous sclerosis and Friedreich ataxia, *J Neurol Sci*. 2004 Jun 15; 221(1-2): 91
130. Oyama T, Mitsudomi T, Kawamoto T, Ogami A, Osaki T, Kodama Y, Yasumoto K, Detection of CYP1A1 gene polymorphism using designed RFLP and distributions of CYP1A1 genotypes in Japanese, *Int Arch Occup Environ Health*. 1995;67(4): 253-6

131. Wang J, Pan K, Li D, Lu D, The relationship between donor TNFalpha -308 (G/A) genotype and recipient acute GVHD in allo-BMT, *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2002 Aug;23(8):397-9
132. Takahashi H, Furukawa T, Hashimoto S, Suzuki N, Kuroha T, Yamazaki F, Inano K, Takahashi M, Aizawa Y, Koike T, Contribution of TNF-alpha and IL-10 gene polymorphisms to graft-versus-host disease following allo-hematopietic stem cell transplantation, *Bone Marrow Transplant*. 2000 Dec;26(12):1317-23

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle gilt dies für meinen Doktorvater Professor Dr. H. Einsele für die Vergabe des Themas und das Interesse an der Arbeit.

Insbesondere danke ich Herrn PD Dr. J. Löffler für die engagierte und motivierte Betreuung, für seine stete Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion sowie für die Durchsicht des Manuskriptes.

Frau Ingrid Kumbier und Frau Maria Markuljin danke ich für die praktische Unterstützung und Einführung in die Laborarbeit sowie für die nette Atmosphäre im Labor.

Lebenslauf

Name Paschalinou
Vorname Eleni
Geburtsdatum/-Ort 10.01.1980 in Turkey/Türkei
Familienstand ledig

Schulbildung

1985-1991 Grundschule in Komotini/Griechenland
1991-1994 Gymnasium in Komotini/Griechenland
1994-1997 Lyzeum im Komotini/Griechenland
1997 Abitur im Komotini/Griechenland
1997-1998 Sprachkurs Deutsch im Sprachinstitut Tübingen

Studium

04/1998 Studium der Humanmedizin an der Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt/Main
10/1998 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
04/2003-03/2004 Praktisches Jahr (Wahlfach: Anästhesie)
29.04.2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2004 Approbation als Ärztin

Berufliche Tätigkeit

14.04.05-15.01.06 Assistenzärztin in der Augenklinik am Allgemeinkrankenhaus von Agios Nikolaos/Griechenland
24.01.06-25.07.06 Assistenzärztin in der Augenklinik am Allgemeinkrankenhaus von Tripolis/Griechenland
09/2006-16.05.07 Gastärztin in der Augenklinik am Allgemeinkrankenhaus von Komotini/Griechenland
seit 17.05.2007 Landärztin am Allgemeinkrankenhaus von Komotini und Gesundheitszentrum von Iasmos/ Griechenland