

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Untersuchung von Einzelbasensubstitutionen (SNPs)
in Toll-like-Rezeptor-Genen mittels LightCycler Technologie
bei Patienten nach allogener Knochenmark- oder
Stammzelltransplantation
im Zusammenhang mit der Analyse klinischer Risikofaktoren
für eine Cytomegalievirus-Reaktivierung bzw. Erkrankung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Claudia Sabrina Semmler
aus
Stuttgart

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Einsele
2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Jahn

1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Stammzelltransplantation	1
1.1.1 Entwicklung der allogenen Blutstammzelltransplantation (BSZT)	1
1.1.2 Indikationen der Stammzelltransplantation (SZT)	3
1.1.3 Ablauf der Blutstammzelltransplantation.....	3
1.2 Komplikationen der Stammzelltransplantation	5
1.2.1 Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (Graft-versus-Host-Disease)	5
1.2.2 Infektionen nach SZT	6
1.3 Das humane Cytomegalievirus (HCMV)	7
1.3.1 Epidemiologie der Cytomegalieviren.....	7
1.3.2 Struktur und Genom der Cytomegalieviren.....	7
1.3.3 Pathologie und Pathogenese der Cytomegalieviren	8
1.4 Immunabwehr	9
1.4.1 Mechanismen der Immunabwehr.....	9
1.4.2 Immunantwort auf HCMV bei immunkompetenten Individuen	11
1.4.3 Immunologische Rekonstitution nach SZT	11
1.5 CMV-Reaktivierung	12
1.5.1 Risikofaktoren für eine Reaktivierung des Cytomegalievirus	12
1.5.2 Diagnostik und Therapie der CMV- Reaktivierung.....	12
1.6 Toll-like Rezeptoren (TLR)	13
1.8 Single-nucleotid-polymorphism (SNP)	14
1.8.1 Definition und klinische Bedeutung.....	14
1.8.2 Molekulare Auswirkung der SNPs	15
1.8.3 Übersicht über die für diese Arbeit ausgewählten SNPs.....	16
1.9. Fragestellung und Durchführung der Arbeit.....	17
2 PATIENTENKOLLEKTIV, MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Patientenkollektiv	18
2.2 Materialien mit Bezugsquellen	19
2.2.1 Geräte.....	19
2.2.2 Verbrauchsgegenstände.....	20
2.2.3 Reagenzien.....	20

2.3 Methoden	21
2.3.1 Real-time PCR und SNP-Analyse mittels LightCycler Technologie	21
2.3.1.1 Das LightCycler Instrument	21
2.3.1.2 Detektion der PCR-Produkte mit Hybridisierungs-Sonden	22
2.3.1.4 Schmelzkurvenanalyse	24
2.3.1.5 Detektion von Single Nucleotid Polymorphisms (SNPs).....	25
2.3.1.6 Primer und Sonden Design	27
2.3.1.7 PCR Protokoll.....	29
2.4 Statistische Analyse	31
2.4.1 Durchführung der Analysen	32
2.4.2 Armitage's Trend Test.....	33
2.4.3 Allele-Frequenz Differenz Test	33
2.4.4 Allelic Odds Ratio	34
2.4.5 Fisher's exakter Test:.....	34
3 ERGEBNISSE	35
3.1 Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse mit LightCycler Technologie	35
3.1.1 Schmelzkurve und De Finetti Diagramme für TLR 9, rs 352140	35
3.1.2 Ergebnisse für TLR 8, rs 2407992	38
3.1.3 Ergebnisse für TLR 8, rs 3747414	42
3.1.4 Ergebnisse für TLR 8, rs 3764880	47
3.2 ERGEBNISSE DER ANALYSE DER KLINISCHEN PARAMETER	53
3.2.1 Vergleich CMV-Serologie.....	53
3.2.2 Vergleich der Transplantationsmodalität.....	54
3.2.3 Konditionierung.....	55
3.2.4 GvHD-Prophylaxe	56
3.2.5 Akute Graft-versus-Host-Disease	57
3.2.6 Chronische Graft-versus-Host-Disease	58
3.2.7 Kortikosteroiddosen	59
3.2.8 Immunologische Rekonstitution	60
Patienten mit männlichen Spendern	60
3.2.9 Überleben	61
3.3 Vergleich der klinischen Risikofaktoren innerhalb der Gruppen	62
4 DISKUSSION	66
4.1 Schmelzkurven- und Assoziationsanalyse	66
4.2 Analyse der Risikofaktoren	71

5. ZUSAMMENFASSUNG	77
6.1 Verteilung der Heterogenitäten für die einzelnen Patienten.....	79
6.2 Übersicht über die klinischen Parameter	83
7. TABELLENVERZEICHNIS	87
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	88
9. LITERATURVERZEICHNIS	90

Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akut Lymphatische Leukämie
AML	Akut Myeloische Leukämie
ATG	Anti-Thymozyten-Globulin
AUL	Akute undifferenzierte Leukämie
bp	Basenpaare
BSZT	Blutstammzelltransplantation
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanosin
CSA	Cyclosporin A
DNA	Desoxyribonucleinacid
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
GvHD	Graft-versus-host-disease
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HHV	Humanes Herpesvirus
HLA	human leukocyte antigen
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
Ig M/G	Immunglobulin G/M
IL	Interleukin
IRAK 1/2	interleukin receptor-activated kinase 1/2
KMT	Knochenmarktransplantation
LED	Lichtemittierende Diode
LPS	Lipopolysaccharid
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	major histocompatibility complex
MMF	Mycophenolat mofetil
mRNA	Messenger Ribonucleinacid
NFκ-B	Nukleärer Faktor kappa B
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
OMF	Osteomyelofibrose
PBSZ	Periphere Blutstammzellen
PBSZT	Periphere Blutstammzelltransplantation
PCR	Polymerase chain reaction
PNH	Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
RNA	Ribonucleinacid
SAA	Schwere aplastische Anämie
SNP	Single nucleotid polymorphism
SZT	Stammzelltransplantation
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
Tollip	toll interacting protein
TRAF6	tumor necrosis factor receptor-associated factor 6
TZR	T-Zell Rezeptor

1 Einleitung

1.1 Die Stammzelltransplantation

1.1.1 Entwicklung der allogenen Blutstammzelltransplantation (BSZT)

Als therapeutisches Verfahren hat die allogene Blutstammzelltransplantation in den letzten 15 Jahren einen festen Platz im Behandlungskonzept einiger hämatologischer und onkologischer Krankheitsbilder erhalten.

Schon seit den 50er Jahren ist die Theorie der BSZT aus dem Tiermodell bekannt [40]. Lorenz und Mitarbeiter konnten 1951 zeigen, dass mit letaler Ganzkörperbestrahlung behandelte Nagetiere durch Übertragung von Zellen des Knochenmarks eines anderen Tieres die Aplasiephase überlebten und hämatologisch regenerieren konnten [53]. Weitere tierexperimentelle Ergebnisse führten Ende der 50er Jahre zu den ersten Therapieversuchen beim Menschen. Die Arbeitsgruppe um E.D. Thomas hat 1957 erstmals über eine allogene Knochenmarktransplantation berichtet. Einem 63 Jahre alten Mann mit Multiplem Myelom wurde nach Ganzkörperbestrahlung Knochenmark injiziert [88].

Nach anfänglicher Euphorie wurde die Anzahl der durchgeführten Knochenmarktransplantationen in den folgenden Jahren geringer, da schlechte Behandlungsergebnisse mit häufigem Auftreten von tödlichen Komplikationen nicht selten waren [11].

Die Entdeckung und Beschreibung leukozytenspezifischer Gewebemerkmale in Hunden, durch Mitarbeiter von E.D. Thomas, brachte weitere Fortschritte. Sie zeigten, dass sich bei Auswahl der Spendertiere nach diesen Gewebemerkmalen die Blutbildung im Empfänger über Monate stabilisieren ließ [21, 77].

Mit der Übertragung der Befunde in das humane System, und der Erforschung des humanen Histokompatibilitätskomplexes (HLA), gelangen beim Menschen Anfang der 70er Jahre in Seattle erfolgreiche Knochenmarktransplantationen mit gewebesidentischen Geschwisterspendern [87].

Die Übertragung von Knochenmark von HLA-identischen Spendern wurde in der nachstehenden Zeit zunehmend praktiziert. Anfänglich wurden nur Geschwister oder Familienangehörige als Spender ausgewählt.

Die Entwicklung serologischer und später molekularbiologischer Methoden zur HLA-Typisierung ermöglichte eine gezielte Spenderauswahl, und hatte in der folgenden Zeit erheblichen Einfluss, die Übertragung von Knochenmark als therapeutisches Prinzip zu etablieren [19, 78, 90].

Die allogene HLA-identische Knochenmarktransplantation (KMT) gilt seit Ende der 70er Jahre als anerkanntes Therapieverfahren und wird seit 1973 an der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen durchgeführt [86].

In der folgenden Zeit, Anfang und Mitte der 80er Jahre, nahm die Zahl unverwandter Spender zu, ebenso wurden zunehmend Versuche mit nicht HLA-identischen Spendern praktiziert [30].

Auch im peripheren Blut kommen hämatopoetische Stammzellen vor, sie sind durch das Oberflächenantigen CD34 charakterisiert.

Durch den Einsatz von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wird die Bildung und Mobilisierung der CD34 Stammzellen verstärkt [28]. Dieser granulozytenkoloniestimulierende Faktor (G-CSF) kann seit Mitte der 80er Jahre rekombinant hergestellt werden und ist seit 1991 zugelassen [8].

Durch die Anwendung bei potentiellen Spendern können die Blutstammzellen mobilisiert werden und in das periphere Blut gelangen. Mit Zellseparatoren werden die Stammzellen maschinell von anderen Blutbestandteilen getrennt, mit dem Ziel eine ausreichende Menge für das Transplantat zu gewinnen [69]. Dank diesem Verfahren wird die klassische Methode der Knochenmarkgewinnung aus den Beckenkämmen in Vollnarkose ergänzt, bzw. immer mehr ersetzt und findet von Seiten des Spenders eine bessere Akzeptanz [64,74].

Beide Methoden, die Knochenmarktransplantation (KMT) und die Verpflanzung peripherer Blutstammzellen (PBSZT) werden als autologe (vom Patienten selbst) und allogene (verwandter oder fremder Spender) Transplantation von HLA-kompatiblen und HLA-nicht-kompatiblen Spendern durchgeführt [32].

1.1.2 Indikationen der Stammzelltransplantation (SZT)

Neben dem Einsatz bei angeborenen Immundefekten wie z.B. dem schweren kombinierten Immundefekt (SCID) und Blutbildungsstörungen wie der schweren aplastischen Anämie (SAA) [39], gilt die hämatopoetische SZT heute als standardisiertes Therapieverfahren bei verschiedenen malignen Erkrankungen/ Neoplasien der Blutzellbildung [80].

Die akut myeloische Leukämie (AML), die akut lymphatische Leukämie (ALL) und die chronische myeloische Leukämie (CML) sind die häufigsten Indikationen für eine Blutstammzelltransplantation [26, 89]

Bei der CML und dem myelodysplastischen Syndrom (MDS) besteht durch die BSZT die Möglichkeit der Kuration [2].

Die allogene SZT kann bei Patienten mit der Grunderkrankung ALL oder AML zu langfristigen Remissionen führen.

Eine weitere Indikation sind Non Hodgkin Lymphome (NHL), M.Hodgkin Lymphome und das Multiple Myelom [25, 48, 96].

1.1.3 Ablauf der Blutstammzelltransplantation

Sie gliedert sich in drei Phasen:

1. Konditionierung
2. Aplasie
3. Hämatologische und immunologische Regeneration

Vor der Transplantation (Tag -6) muss sich der Patient zunächst einer 5-tägigen Konditionierungstherapie unterziehen. Abhängig von der Grunderkrankung erhält der Patient entweder eine Kombination aus Ganzkörperbestrahlung und Zytostatika wie Cyclophosphamid (CY), oder eine Behandlung aus Kombination hochdosierter alkylierender Substanzen wie Busulfan (Bu), Melphalan (Me) und Cyclophosphamid. Ziel ist die Reduzierung bzw. Elimination maligner Zellen. Nach dem Ende der Konditionierungsbehandlung erfolgt die Übertragung des Transplantats (Tag 0), möglichst mit kompletter Analogie von Spender und Empfänger bezüglich der HLA-Merkmale, um die Hämatopoese des Spenders im Patienten zu etablieren. Gleiche Identität bezeichnet man als „Match“, bei Nichtübereinstimmung spricht man von „Mismatch(es)“ [73].

Die Phase der Aplasie schließt sich mit einer Dauer von 2-3 Wochen an. Die Zeitspanne hängt von der Anzahl der übertragenen Vorläuferzellen ab. Wenn PBSZ transfundiert wurden ist im Vergleich zu transplantiertem Knochenmark mit einer 2-3 Tage kürzeren Neutropeniedauer zu rechnen [67].

Den angestrebten Verlauf der hämatologischen Erholung bezeichnet man als Engraftement.

Falls die Stammzellen des Spenders erfolgreich angenommen werden, besteht oft noch kurz nach Transplantation eine Mischung aus Empfänger- und Spenderzellen im Blut, ein sogenannter lymphohämatopoetischer Chimärismus. Dieser ist nicht stabil und geht im Laufe der Zeit in eine Dominanz der Spenderzellen über, dann liegt ein Spenderchimärismus vor [73].

1.2 Komplikationen der Stammzelltransplantation

Toxische Nebenwirkungen der Konditionierungstherapie [7], Transplantatversagen (graft-failure), Auftreten eines Rezidivs der Grunderkrankung und Entwicklung einer Lebervenenverschlusskrankheit (veno-occlusive-disease, VOD) [55] stellen Risiken nach Transplantation dar.

Schwerwiegende Probleme waren und sind das Auftreten einer Transplantat-gegen-Wirt Reaktion (Graft-versus-Host-Disease; GvHD) und die Entwicklung von Infektionen [85].

1.2.1 Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (Graft-versus-Host-Disease)

Hierbei handelt es sich um eine Reaktion immunkompetenter Spenderzellen gegen Körperzellen des Empfängers. Antigenpräsentierende Zellen (APC) aus verschiedenen Organen des Empfängers aktivieren Spender-T-Lymphozyten und führen zu Entzündungsreaktionen, vor allem im Bereich der Haut, der Leber und des Darms [18].

Zielantigene sind besonders Minor-Histokompatibilitätsantigene, aber auch organspezifische Strukturproteine [23].

Das klinische Bild kann von Symptomen eines Exanthems, Übelkeit, Erbrechen bis zu generalisierter Blasenbildung, Ileus und einem Ikterus führen [94].

Prophylaktisch erfolgt drei bis sechs Monate lang die Gabe von Immunsuppressiva, wie Cyclosporin A (CSA), Methotrexat (MTX) oder Prednisolon (Pred) [17, 76]. Neuere Substanzen wie Mycophenolat mofetil (MMF), Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) oder Antikörper gegen humane T-Zell-Rezeptoren (OKT3) werden prophylaktisch bzw. zusätzlich beim Auftreten einer GvHD eingesetzt [10, 36, 61].

Man unterscheidet eine akute von einer chronischen Form. Eine akute GvHD wird definitionsgemäß während der ersten 100 Tage nach Transplantation klinisch manifest. Besteht sie nach Tag 100 weiterhin oder treten eine Dermatitis, Hepatitis oder Kolitis danach auf, spricht man von einer chronischen GvHD [94].

1.2.2 Infektionen nach SZT

Das Vorliegen eines schweren Immundefekts nach Transplantation, bedingt durch die Grunderkrankung und die immunsuppressive Therapie, macht die Patienten für Infektionen sehr anfällig.

Besonders in den ersten 2-3 Wochen, dem Stadium der Aplasie, sind Bakterien und Pilze wie *Candida* spezies und insbesondere *Aspergillus* spp, die häufigsten Infektionserreger [97].

Virusinfektionen nach Stammzelltransplantation werden hauptsächlich durch die Gruppe der Herpesviren, insbesondere durch das Cytomegalievirus (CMV), verursacht. Trotz erheblicher Fortschritte in Diagnostik und Therapie stellen CMV-Reaktivierung und Erkrankung noch immer eine lebensbedrohliche Komplikation dar [37, 50].

1.3 Das humane Cytomegalievirus (HCMV)

1.3.1 Epidemiologie der Cytomegalieviren

Das Cytomegalievirus (CMV) gehört zur Familie der humanen Herpesviren (HHV). Die Arten Herpes-simplex Virus 1,2 (HSV1,2), Varicella-Zoster-Virus (HHV3), der bekannte Erreger der Windpocken und der Gürtelrose, das Epstein-Barr-Virus (HHV4) und die Humanen Herpesviren 6, 7 und 8 zählen ebenfalls zur Gruppe der Herpesviridae.

Cytomegalieviren kommen ubiquitär vor. Abhängig von sozioökonomischen Faktoren liegt die Durchseuchungsrate in Deutschland und vergleichbaren Industrienationen im Erwachsenenalter bei 40-60%. In Entwicklungsländern beträgt sie bereits im Kindesalter bis zu 100% [59].

Die Übertragung des Virus von Mensch zu Mensch erfolgt hauptsächlich über Blut, Bluttransfusionen, über Körpersekrete wie Speichel, Zervikal- und Vaginalschleim und Sperma. CMV kommt in Tränenflüssigkeit und Muttermilch vor und wird mit dem Urin und Faeces ausgeschieden. Organ- und Knochenmarktransplantationen stellen ein Risiko zur Übertragung dar.

1.3.2 Struktur und Genom der Cytomegalieviren

Wie alle Herpesviren besitzt das Cytomegalievirus eine lineare doppelsträngige DNA mit einem Kapsid vom ikosaedrischen Typ, das von Tegument, mit seinem Hauptprotein pp65, umgeben ist.

Die äußere Umhüllung besteht aus einer Membran mit Glykoproteinen. Das CMV ist das größte seiner Familie und hat einen Durchmesser von ca. 200nm. Der humane Laborstamm AD169 ist vollständig sequenziert und trägt ein 230 kilobasenpaare langes Genom [3].

Die HCMV-Proteine lassen sich in drei Gruppen einteilen: „immediate-early“, „early“ und „late“. Immediate-early Proteine regulieren die Transkription des viralen Genoms. Viele Enzyme wie die virale DNA-Polymerase, die für die DNA- und Proteinsynthese notwendig ist, gehören zu den early Proteinen.

Die Gene für die late-Eiweiße kodieren für die meisten Strukturproteine des Virions [29].

1.3.3 Pathologie und Pathogenese der Cytomegalieviren

Eine Infektion mit CMV führt zu einer typischen Zellvergrößerung (griechisch cytos = Zelle, megas = groß) und ist durch die Bildung von Einschlusskörperchen (Eulenaugenzellen) charakterisiert.

Primär werden Zellen der Speicheldrüsen infiziert. Das Virus repliziert sich in verschiedenen Zelltypen und Geweben wie z.B. Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen und in Zellen der glatten Muskulatur.

Bei immunkompetenten Personen verläuft die Primärinfektion meist ohne klinische Symptome ab. Gelegentlich kann es zu einem mononukleose-ähnlichen Erscheinungsbild mit Lymphknotenschwellung und Fieber kommen.

Meist gelingt dem Wirt keine vollständige Elimination, so dass in vielen Organen eine lebenslängliche Persistenz mit der Möglichkeit der Reaktivierung bestehen bleibt.

Nach Erstinfektion kommt es zu einer Serokonversion. CMV-spezifische IgG-Antikörper bleiben sehr lange nachweisbar [60].

Das Cytomegalievirus stellt für Menschen mit angeborener oder erworbener Immunschwäche, wie z.B. AIDS-Patienten, Patienten mit immunsuppressiver Therapie nach Organ- oder Knochenmarktransplantation eine Gefahr dar.

Wenn während der Schwangerschaft bei der Mutter eine Primärinfektion stattfindet, kann sich der Fetus infizieren. In ca. 0,1% der infizierten Fälle kann es zu einem schweren Krankheitsbild mit Mikrozephalus, Hepatosplenomegalie und Hörschäden führen [14].

1.4 Immunabwehr

1.4.1 Mechanismen der Immunabwehr

Man unterscheidet äußere Schutzbarrieren, eine angeborene und eine erworbene Immunität.

Die Haut hält einen Großteil der Erreger ab, die Zilienbewegung des Flimmerepithels der Atemwege transportiert in der Atemluft vorhandene Partikel hinaus. Die Salzsäure im Magen sorgt für ungünstige pH-Verhältnisse für Eindringlinge. Das Lysozym in der Tränenflüssigkeit, im Speichel und in anderen Sekreten kann Murein aus der Bakterienhülle spalten und eine Lyse des Bakteriums bewirken.

Wenn die Keime diese äußeren Schutzbarrieren überwinden, helfen weitere Abwehrmechanismen.

Zur angeborenen nicht-adaptiven Immunität gehören Makrophagen, die Rezeptoren für bakterielle und virale Substanzen besitzen und Fremdartigen präsentieren können. Natürliche Killerzellen, die zytotoxisch für virusinfizierte Zellen sind und bestimmte Tumorzellen abtöten können, gehören ebenso wie antigenpräsentierende dendritische Zellen in diese Gruppe.

Die Antigenerkennung erfolgt über mustererkennende Moleküle (Pattern recognition receptors, PRRS), z.B. über LPS- oder Toll-like-Rezeptoren (TLR).

Ein weiterer Weg in der Immunabwehr ist durch die Funktion der erworbenen Immunität und den dafür verantwortlichen B- und T-Lymphozyten möglich. Sie können sich auf neue bzw. veränderte Erreger einstellen und speziell angepasste Erkennungsmoleküle herstellen. Man bezeichnet dies auch als adaptive Immunität.

Alle Lymphozyten entstehen aus im Knochenmark lokalisierten hämatopoetischen Stammzellen.

B-Lymphozyten sind für die humorale Immunität bedeutend. Sie reifen im Knochenmark (bone marrow). Ursprünglich bezog sich das B im Namen auf die Bursa fabricii der Vögel. Bei Hühnern findet dort die B-Zellreifung statt.

Diese Immunzellen produzieren über Plasmazellen Antikörper und Gedächtniszellen.

T-Lymphozyten reifen im Thymus heran. Sie regulieren die Antikörperherstellung und führen selbst Effektorfunktionen aus. Im Gegensatz zu Antikörpern, die auch komplexe Substanzen in nativem Zustand erkennen, reagieren T-Zellen nur auf prozessiertes Antigen, das auf anderen Zellen auf HLA-Molekülen präsentiert wird.

Zur Antigenerkennung besitzen sie einen T-Zell-Rezeptor (TZR). Man unterscheidet einerseits T-Helfer-Zellen mit CD4-Marker, die Antigene in Verbindung mit MHC II (major histocompatibility complex) erkennen und unter anderem die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen regulieren.

Des Weiteren gibt es zytotoxische CD8-T-Lymphozyten, die zur Antigenerkennung auf MHC I angewiesen sind und zu deren Funktion es gehört, virusinfizierte Zellen zu erkennen und durch Ausscheidung zytotoxischer Substanzen abzutöten.

Adaptives und angeborenes Immunsystem sind eng miteinander verbunden. T-Zellen, die noch kein Antigen erkannt haben, benötigen zusätzlich zum Signal über den TZR eine Kostimulation. Diese kann durch Zytokine antigenpräsentierender Zellen oder über Toll-like-Rezeptoren vermittelt werden.

1.4.2 Immunantwort auf HCMV bei immunkompetenten Individuen

Der Organismus bildet während der Erstinfektion mit CMV spezifische IgM- und IgG-Antikörper. Die Bildung von zytotoxischen T-Zellen wird induziert. Die CD8-T-Lymphozyten erkennen im Zusammenhang mit HLA I präsentierte CMV-Antigene und können diese schon kurze Zeit nach der Infektion abtöten.

Neben den zytotoxischen T-Zellen spielen CD4-T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen und neutralisierende Antikörper, die hauptsächlich gegen das Glykoprotein gB der Hüllmembran gerichtet sind, für die Immunantwort auf HCMV eine Rolle [60, 66, 75].

1.4.3 Immunologische Rekonstitution nach SZT

Die SZT führt zu schweren Defekten der äußeren Schutzbarrieren und des humoralen und zellulären Immunsystems.

Zwölf Wochen nach Transplantation können normale Lymphozytenzahlen ($>200/\mu\text{l}$) erreicht werden, es handelt sich hierbei vor allem um B-Lymphozyten. Ihre Funktion bleibt aber über Monate eingeschränkt, so dass man eine normale Serumkonzentration von Immunglobulinen IgG und IgM erst nach ca. 9 Monaten messen kann.

Eine durchschnittliche CD8-T-Lymphozyten-Zahl wird erst 4-6 Monate nach Transplantation erreicht. Die Rekonstitution der CD4-Zellen dauert 6-12 Monate. Entwickelt der Patient eine akute oder insbesondere eine chronische GvHD, dauert die Rekonstitution länger [4, 65].

Aufgrund der Schwäche des Immunsystems nach Transplantation besteht für den Empfänger die Gefahr das CMV zu reaktivieren, vorausgesetzt er oder sein Spender sind CMV-seropositiv.

1.5 CMV-Reaktivierung

1.5.1 Risikofaktoren für eine Reaktivierung des Cytomegalievirus

Das Risiko der Reaktivierung ist in den ersten 100 Tagen nach Transplantation am größten. Zwar konnten Fortschritte in Prophylaxe, Diagnostik und Therapie die Morbidität und Mortalität einer HCMV Infektion bzw. Erkrankung nach SZT senken, sie stellt aber nach wie vor ein Problem dar.

Das Risiko der Reaktivierung liegt zwischen 30% und 50% [5, 58]. Die Gefahr für eine klinisch manifeste CMV Erkrankung, die einer Reaktivierung folgen kann, liegt bei 8% bis 16% [50, 99]. Sie kann sich klinisch als Kolitis, als Hepatitis und in der Lunge als interstitielle Pneumonie manifestieren [31, 98]. Wird die CMV-Pneumonie nicht behandelt, führt sie in bis zu 100% der Fälle zum Tod [49].

Risikofaktoren für eine Reaktivierung ist ein CMV positiver Empfänger [12], höheres Alter bei Transplantation, ein Transplantat eines unverwandten Spenders oder eines verwandten Spenders mit mismatch [50]. Ebenfalls zählen die Entwicklung einer GvHD [58] und eine verzögerte oder fehlende Rekonstitution des zellulären Immunsystems dazu [20].

1.5.2 Diagnostik und Therapie der CMV- Reaktivierung

Cytomegalieviren lassen sich aus Urin, Speichel, Liquor und Rachenspülwasser isolieren und in menschlichen Zellen, speziell in embryonalen Lungenfibroblasten, anzüchten. Dieser Vorgang dauert allerdings mehrere Wochen.

Mit Hilfe von Immunfluoreszenz kann bereits nach 1 bis 2 Tagen das pp65 Protein in Leukozyten nachgewiesen werden. Mit ELISA Testverfahren kann man spezifische CMV-Antikörper detektieren. Alternativ lassen sich anhand einer Polymerasekettenreaktion (PCR) virale Nukleinsäuren nachweisen.

Ganciclovir, Foscarnet oder Cidofovir stehen zur Therapie einer CMV Infektion zur Verfügung [60].

1.6 Toll-like Rezeptoren (TLR)

Sie gehören zu einer Rezeptorfamilie, die Antigene über mustererkennende Moleküle (Pattern recognition receptors, PRRs) erkennt. Wenn es sich um krankheitsassoziierte molekulare Muster handelt, spricht man auch von PAMPs = pathogen associated molecular patterns.

Toll-like Rezeptoren sind Transmembranmoleküle mit einer extrazellulären, Leucin reichen Domäne und einer transmembranalen Region. Ein zytoplasmatischer Teil, der dem Interleukin-1 Rezeptor ähnelt und die Bezeichnung Toll/Interleukin-1 Rezeptor (TIR) trägt, schließt sich an.

Der Begriff Toll bezieht sich auf ein Gen in *Drosophila*, das für den Toll-Rezeptor codiert. Er spielt für *Drosophila*, auch bekannt unter dem Namen Tau- oder Fruchtfliege, für die Entwicklung der dorsal-ventral Achse eine Rolle und hat eine Funktion in der angeborenen Immunabwehr [34].

Aufgrund großer Homologie in der Gensequenz und Struktur von definierten Rezeptoren des Menschen zu diesen Toll-Rezeptoren, hat man sie Ende der 90er Jahre als Toll-like Rezeptoren benannt [57]. Elf verschiedene Typen, TLR 1 bis TLR 11 sind bekannt, sie erkennen spezifische Liganden und werden unter anderem auf Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert [41, 62]. Folgende Übersicht zeigt die in dieser Arbeit untersuchten Toll-like Rezeptoren mit ihren spezifischen Liganden.

Rezeptor	Ligand
TLR 3	Doppelsträngige virale RNA [1]
TLR 8	einzelsträngige RNA [38]
TLR 9	unmethylierte CpG-Motive [6]

Nach Ligandenbindung und Konformationsänderung des TIR werden die Proteine MyD88 und Tollip rekrutiert.

Über Adapterproteine wie z.B. IRAK-1 und 2 und Traf 6 kommt es zur Aktivierung von NF- κ B [35].

NF- κ B ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Aktivierung immunrelevanter Gene. Die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1, IL6, IL-8, IL-10 und IL-12 wird induziert [43].

Darüberhinaus sind für TLR3 und TLR4 MyD88-unabhängige Signalwege beschrieben [24].

1.8 Single-nucleotid-polymorphism (SNP)

1.8.1 Definition und klinische Bedeutung

Sowohl in translatierten Genen als auch in nicht translatierten Bereichen entstehen durch Mutationen Unterschiede in der Nukleotidsequenz.

Häufig wird der Begriff Punktmutation synonym zu Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) verwendet. Punktmutationen haben allerdings eine Frequenz von kleiner einem Prozent in der Population.

Wenn dagegen bezüglich eines Merkmals mindestens zwei Phänotypen, die auf mindestens zwei Genotypen zurückzuführen sind, vorkommen und diese mindestens mit einer Frequenz von 1-2% auftreten, spricht man von genetischem Polymorphismus. SNPs treten in der humanen DNA statistisch mit einer Häufigkeit von 1:1000 auf. Sie sind nicht homogen über das Genom verteilt. Die Wahrscheinlichkeit der SNP-Lokalisation in Introns ist größer als in Exons. Sie beträgt in nicht kodierenden Regionen 1:500 und in kodierenden Abschnitten 1:2000 [56, 92]. Der erste genetische Polymorphismus wurde von Landsteiner im Jahre 1900 im ABO-Blutgruppensystem entdeckt [84].

Punktmutationen sind mit Erbkrankheiten wie z.B. β -Thalämie oder mit der hereditären Hämochromatose [44] assoziiert. Sie stehen in Zusammenhang mit Resistenzen gegenüber antibakterieller und antiviraler Therapie [93].

Eine SNP-Genotypisierung kann zum Identitätsnachweis in Vaterschaftstests und zur Täterbestimmung in kriminalistischen Fragestellungen dienen, da jeder Mensch eine individuelle SNP-Ausstattung besitzt.

1.8.2 Molekulare Auswirkung der SNPs

Basensubstitutionen lassen sich gemäß ihrer Auswirkung in drei Gruppen einteilen:

- Synonyme oder stille Substitutionen führen zu keinem Aminosäureaustausch. Dies gilt vor allem für die dritte Position eines Kodons, da eine an dieser Position veränderte Base sehr häufig für die gleiche Aminosäure kodiert (Wobble-Position). Auch stille Basensubstitutionen können pathogen wirken, wenn sie Spleißstellen inaktivieren.
- Missense-Mutationen führen zu nicht synonymen Substitutionen. Man kann sie in konservative Substitutionen, bei denen eine Aminosäure durch eine chemisch ähnliche ausgetauscht wird und in nicht konservative, die zum Ersatz einer Aminosäure mit anderer chemischer Funktion führt, einteilen.
- Eine dritte Gruppe sind Nonsense-Mutationen, bei denen es zu einem nicht synonymen Austausch kommt und ein ehemals für eine Aminosäure codierendes Triplet zu einem Stoppkodon mutiert [47, 79].

Seltener ist der Verlust eines Basenpaares (Deletion) oder die Integration eines neuen (Insertion), was mit der Verschiebung des Leserasters (engl. Frameshift) verbunden ist. Dies zieht nachfolgend eine komplette Veränderung der Aminosäure-Sequenz nach der Stelle der Mutation, mit sich.

Wenn das Terminationscodon mutiert ist, kommt es zu einer mRNA-Verlängerung mit anschließender Bildung einer unsinnigen Polypeptidkette.

Falls die Promotorregion betroffen ist, kann dies zu einer veränderten Genexpression oder zu einem völligen Ausfall der Transkription mit der Entstehung von inaktiven Pseudogenen führen [84].

1.8.3 Übersicht über die für diese Arbeit ausgewählten SNPs

Auswahlkriterien:

1. Lokalisation in Exons → für das Genprodukt bedeutende Sequenzen
2. Aminosäureaustausch → mögliche Auswirkung auf die Rezeptorfunktion durch eine veränderte Proteinstruktur
3. Validiert by frequency → „Gültigkeit“ durch Analyse der Gensequenzen an bestimmter Populationsgröße, mit der Möglichkeit die Allelfrequenzen zu berechnen
4. Allelhäufigkeit → $\geq 0,1$, da die Wahrscheinlichkeit SNPs zu detektieren zu gering ist

Tabelle 1 Übersicht der in der Arbeit verwendeten SNPs

TLR = Toll-like-Rezeptor SNP = Single nucleotid polymorphism
 AS = Aminosäure rs = reference SNP
 p = petit (kurzer Arm des Chromosoms) q = langer Arm des Chromosoms (q folgt p im Alphabet)
 A = Adenin C = Cytosin G = Guanosin T = Thymin

TLR und SNP-Bezeichnung	Chromosom und Lokus	Exon-Lokalisation	Validiert by frequency	Allele	Allelhäufigkeit der Heterozygoten	Kodonposition	Codierte AS und eventl. Austausch	AS-Position
TLR 3								
rs 3775291	4q35.1	ja	ja	A / G	0,4	1	Leucin / Phenylalanin	412
rs 5743318	4q35.1	ja	ja	A / T	0.1	1	Serin / Threonin	737
TLR 9								
rs 352140	3p21.3	ja	nein	C / T	0,5	3	Prolin	545
rs 5743842	3p21.3	ja	ja	C / T	0,1	1	Arginin / Cystein	5
TLR 8								
rs 2407992	Xp22.2 2	ja	nein	C / G	0,4	3	Leucin	669/ 561
rs 3747414	Xp22.2 2	ja	ja	A / C	0,5	3	Isoleucin	769/ 751
rs 3764880	Xp22.2 2	ja	ja	A / G	0,4	1	Methionin/ Valin	1
rs 5744077	Xp22.2 2	ja	ja	A / G	0,2	1	Methionin / Valin	28/ 10

1.9. Fragestellung und Durchführung der Arbeit

Für Patienten nach Knochenmarktransplantation oder nach Übertragung peripherer Stammzellen ist eine CMV-Reaktivierung bzw. Erkrankung nach wie vor mit schweren Folgen verbunden. Die Analyse der Ursachen und Risikofaktoren und damit die Möglichkeit einer gezielten Prophylaxe und Therapie ist zur Sicherung der Lebensqualität für die betroffenen Patienten wichtig.

Außer den bekannten klinischen Risikofaktoren für eine Reaktivierung des Cytomegalievirus könnten andere Faktoren, z.B eine veränderte Genstruktur bzw. Funktion, der an der Virusimmunabwehr bedeutsamen Komponenten eine Rolle spielen.

Im Rahmen eines anderen Projekts zeigte sich bei Versuchen der Arbeitsgruppe, dass mit CMV exponierte dendritische Zellen verstärkt Toll-like-Rezeptor 3 exprimierten.

Aufgrund dieses interessanten Ergebnisses wurde beschlossen, definierte Einzelbasensubstitutionen in Toll-like Rezeptoren zu untersuchen und ihre Häufigkeit in den folgenden Gruppen zu vergleichen: Patienten mit CMV-Reaktivierung, mit einer Erkrankung durch das Cytomegalievirus und Patienten ohne Virus-Reaktivierung.

Durchführung:

1. Auswahl eines geeigneten Patientenkollektivs
2. Wahl der SNPs in Toll-like-Rezeptoren
3. Schmelzkurven- und SNP-Analyse mittels LightCycler Technologie
4. Dokumentation und Auswertung klinischer Risikofaktoren für eine CMV-Reaktivierung
5. Assoziationsanalyse der Allel- und Genotypverteilungen

2 Patientenkollektiv, Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Für die Schmelzkurvenanalyse wurde von 146 Patienten Human-DNA aus EDTA-Blut bzw. Knochenmark gewonnen.

Aufgrund hämatologischer Erkrankungen/ Neoplasien erhielten alle Patienten im Zeitraum zwischen Oktober 1994 und September 2003 eine allogene Stammzell- oder Knochenmarktransplantation (SZT: n=80, KMT: n=66).

Diese wurden in den Transplantationszentren der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen Abteilung Innere Medizin II (n=76) und in der Medizinischen Klinik der Universität Essen (n=70) durchgeführt.

Voraussetzung für die Aufnahme in die Analyse war ein positiver CMV-Serostatus des Patienten und/oder des Spenders, der mittels ELISA bestimmt und dokumentiert war.

Von 146 Patienten haben 95 (65,1%) das Cytomegalievirus reaktiviert, d.h. ein positiver Nachweis von CMV pp65 Antigen in Leukozyten mittels Immunfluoreszenz, oder der Nachweis von CMV-DNA mit Polymerasekettenreaktion (PCR) war dokumentiert. 26 dieser Patienten erkrankten am Cytomegalievirus und entwickelten z.B. eine durch das Virus bedingte Pneumonie.

Die klinischen Daten bezüglich CMV-Serologie, Transplantationsmodalität, Konditionierungstherapie, GvHD-Prophylaxe, Entwicklung einer akuten oder chronischen GvHD, Kortikosteroiddosierung, Laborparameter und Überleben, wurden retrospektiv anhand archivierter Krankenakten erfasst, Stand Mitte April 2004. Sie wurden zwischen den Gruppen CMV nicht reaktiviert, Cytomegalievirus reaktiviert, an CMV erkrankt, bzw. reaktiviert und nicht erkrankt verglichen. Absolute Werte und Prozentangaben befinden sich im Anhang in Tabelle 11.

Tabelle 2 Patientencharakteristika und Diagnosen

Gesamtzahl:	146 Patienten
CMV nicht reaktiviert	51 Patienten
CMV reaktiviert	95 Patienten
Reaktiviert und an CMV erkrankt	26 Patienten
Reaktiviert und nicht an CMV erkrankt	69 Patienten
Geschlecht:	
weiblich	55 Patienten
männlich	91 Patienten
Alter in Jahren	
Median:	46
Streubreite:	18-67
Erkrankung:	Anzahl
CML	52
AML	50
ALL	14
NHL	10
MDS	6
Multiples Myelom	6
SAA	1
AML/ALL	1
AUL	1
Aplastische Anämie	1
CLL	1
M.Hodgkin	1
OMF	1
PNH	1

2.2 Materialien mit Bezugsquellen

2.2.1 Geräte

Computer	Network PC	
Betriebssystem	Windows Me/XP	Microsoft, München
Software	Microsoft Word 2000	Microsoft, München
	Microsoft Excel 2000	
	LightCycler Software	Roche Diagnostics,
	Version 3.5	Mannheim

Software	Sigmastat Version 2.0 SPSS Inc.	Microsoft, München
Drucker	HP LaserJet 2200	Hewlett Packard, München
PCR-Geräte	LightCycler Instrument LightCycler Carousel Centrifuge	Roche Diagnostics, Mannheim
Ultrazentrifuge	Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Sterilbank (PCR)	LaminAir HLB 2472	Heraeus, Hanau
Sterilbank (Extraktion)	Biogard B40-112	Baker Company Sanford, Maine, USA
Vortex	Mixer VM-300	Migge, Heidelberg
Pipetten	Variopipetten 10µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg

2.2.2 Verbrauchsgegenstände

LightCycler Capillaries	20µl	Roche Diagnostics, Mannheim
Pipettenspitzen	10µl, 100µl, 1000µl	Biozym Diagnostik Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße	1,5ml Tubes	Eppendorf, Hamburg

2.2.3 Reagenzien

Primer, Sonden		Tib Molibol, Berlin
PCR	LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes	Roche Diagnostics Mannheim

2.3 Methoden

2.3.1 Real-time PCR und SNP-Analyse mittels LightCycler Technologie

2.3.1.1 Das LightCycler Instrument

Das LightCycler Instrument ist ein PCR-Gerät zur Quantifizierung der DNA und dient der Detektion von SNPs.

Es besteht hauptsächlich aus einem Thermocycler, einer optischen Einheit und einem Probenkarussell.

Raumluft wird mit Hilfe eines Ventilators in das Gerät geleitet und durch eine Heizspirale erwärmt. Während der einzelnen PCR-Schritte reguliert der Thermocycler die Temperatur [100]. Da Luft nur eine geringe Wärmespeicherkapazität hat, kann diese und damit der Probeninhalt, sehr schnell die Temperatur ändern. Es werden bis zu 20 °C/Sekunde mit einer Genauigkeit von $\pm 0,3$ °C erreicht.

Das Probenkarussell fasst 32 Borosilikat-Glaskapillaren mit einem maximalen Inhalt von 20 μ l. Ihre im Verhältnis zum Volumen große Oberfläche begünstigt einen schnellen Wärmetransport und damit eine kurze Zyklendauer, die Aufheizen und Abkühlen beinhaltet.

Ein Motor, der das Probenkarussell ausrichtet, gewährleistet die optimale Position zwischen den einzelnen Kapillaren und der optischen Einheit.

Hier findet die Detektion der PCR Produkte statt. Durch Messung der Fluoreszenz, die von der Kapillarspitze ausgeht, mittels den Photodioden der optischen Einheit, kann die Amplifikation der DNA in Echtzeit simultan am Monitor dargestellt und weiter beobachtet werden. Der ganze Vorgang, die Ausrichtung der Kapillaren und die Fluoreszenzmessung dauert ca. 5 Sekunden.

Die Datenanalyse erfolgt durch die LightCycler Software (Version 3.5).

Abhängig von der Anzahl der PCR Zyklen dauert eine vollständige PCR weniger als eine Stunde.

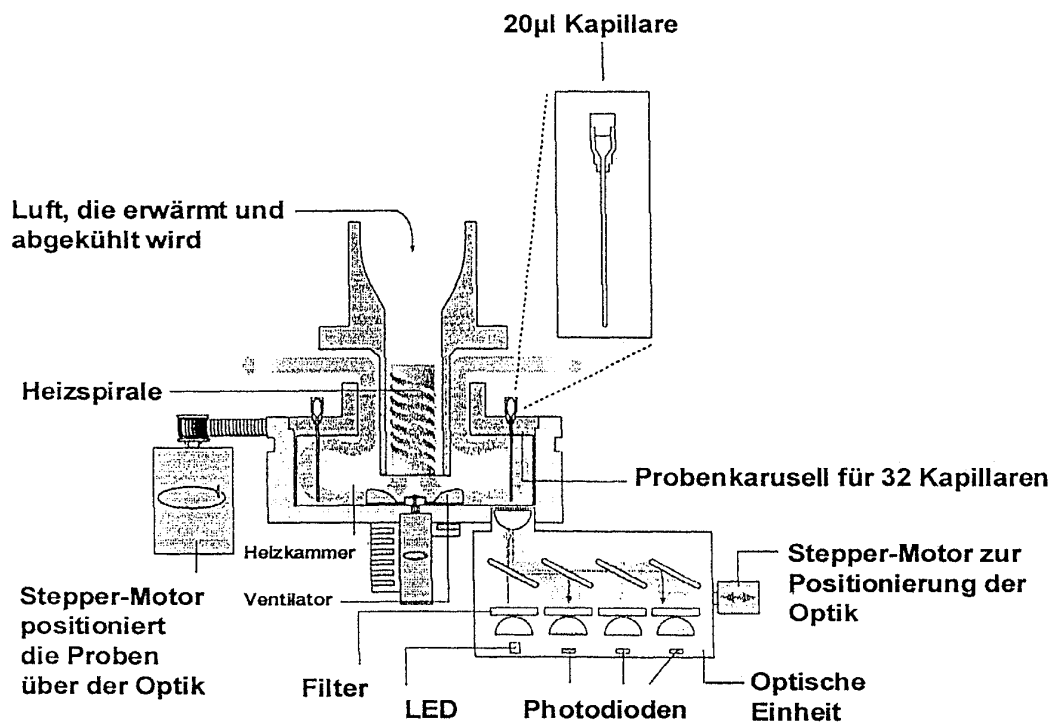


Abbildung 1 Das LightCycler Instrument

(mit freundlicher Genehmigung von Roche Diagnostics)

2.3.1.2 Detektion der PCR-Produkte mit Hybridisierungs-Sonden

Die optische Einheit des LightCyclers kann gleichzeitig in drei verschiedenen Kanälen Licht unterschiedlicher Wellenlänge messen. Kanal 1 (F1) misst die Fluoreszenz bei 530nm, er wird für die Farbstoffe SYBR Green I und Fluorescein verwendet. Signale des Farbstoffs LC Red 640 werden in Kanal 2 (F2; 640nm) registriert und Kanal 3 (F3; 710nm) wird bei Gebrauch von LC Red 705 benötigt. Mit Hilfe von Hybridisierungssonden können die PCR-Produkte detektiert werden.

Die Fluoreszenzfarbstoffe sind an Oligonukleotide gekoppelt, die sequenzspezifisch für die Ziel-DNA sind. Die Sequenz der Sonden wird so gewählt, dass diese in möglichst geringem Abstand (1-5 Nukleotide) zueinander mit der Ziel-DNA hybridisieren.

Sonde 1 trägt am 3'-Ende das Fluorescein. An das 5'-Ende der zweiten Sonde ist z.B. der Farbstoff LightCycler Red 640 gekoppelt.

Die Hybridisierung der DNA kann nur stattfinden, wenn sie einzelsträngig vorliegt, also in der Annealing-Phase (Anlagerungsphase).

Am Ende jeder Anlagerungsphase wird die Fluoreszenz, wenn sie ihr Maximum in diesem Zyklus erreicht hat, gemessen.

Die Lichtquelle der optischen Einheit besteht aus einer LED, die blaues Licht der Wellenlänge 470nm abstrahlt. Dieses Licht trifft gebündelt auf die Kapillarspitze und regt das Fluorescein an. Dort emittiert dieses anschließend grünes Licht (530nm), das in Kanal F1 registriert wird. Durch die freiwerdende Energie wird LC Red 640, gekoppelt an die zweite Sonde, angeregt. Rotes Licht der Wellenlänge 640nm wird abgestrahlt und kann in F2 gemessen werden. Alternativ kann der Farbstoff LC Red 705 verwendet werden, bzw. zusätzlich an das 5'-Ende einer dritten Sonde gekoppelt sein. Er wird dann durch eine parallele Abstrahlung grünen Lichts des Fluoresceins angeregt und sendet entsprechend Licht (710nm) aus, das Messkanal F3 erkennt.

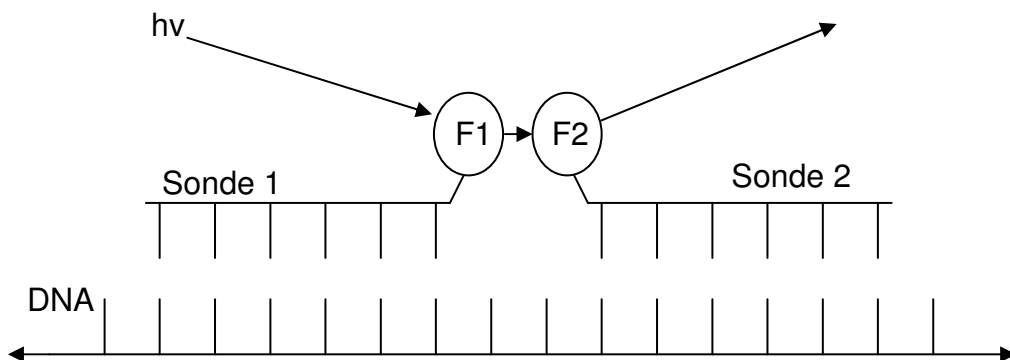


Abbildung 2 Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)

DNA= Desoxyribonucleinacid F1= Fluorescein F2= LC Red 640
hv= Energie der Lichtquanten (h= Planck-Wirkungsquantum,
v= Frequenz)

Der Vorgang der Energieübertragung ist unter der Bezeichnung FRET (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer) bekannt (Abb.2). Entscheidend ist der minimale Abstand zwischen den beiden mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Sonden [16, 101].

2.3.1.4 Schmelzkurvenanalyse

Eine weitere Funktion des LightCycler Instruments ist die Analyse von Schmelzkurven.

Nach dem letzten Amplifikationszyklus werden die PCR-Produkte bei 95°C denaturiert. Anschließend folgt eine Abkühlung auf 55°C damit eine erneute Hybridisierung der farbstoffmarkierten Sonden stattfinden kann. Während die Reaktionsansätze langsam von 55°C auf 95°C erhitzt werden, wird pro Anstieg der Temperatur um 0,2°C die Fluoreszenz gemessen. Sie sinkt mit steigender Temperatur, da sich immer mehr Sonden lösen und der FRET nicht mehr möglich ist.

Die Abbildung 3 veranschaulicht in Bild A die Abnahme der Fluoreszenz bei Erhöhung der Temperatur. Aus der Schmelzkurve erhält man durch die Bildung der ersten negativen Ableitung (Bild B) den Schmelzpunkt.

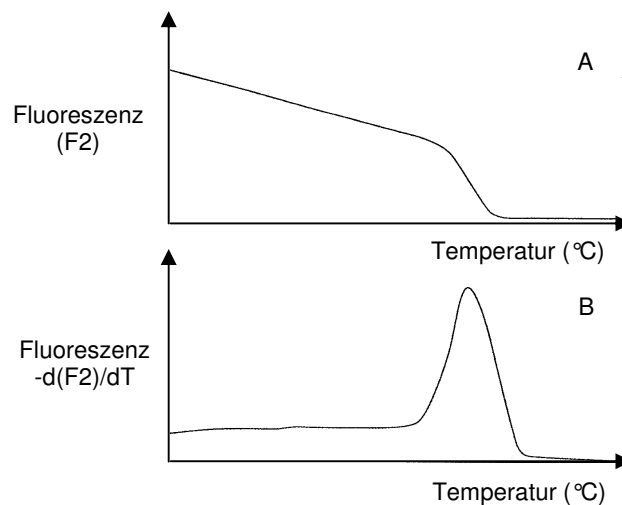


Abbildung 3 Darstellung der Schmelzkurve und des dazugehörigen Schmelzpunkts

Jedes DNA-Produkt hat seinen eigenen spezifischen Schmelzpunkt. Er ist als die Temperatur definiert, bei der 50% der DNA einzelsträngig vorliegen und 50% doppelsträngig verbleiben, bzw. wenn 50% der Sonden gebunden sind und 50% abgelöst sind.

2.3.1.5 Detektion von Single Nucleotid Polymorphisms (SNPs)

Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse und dem Vergleich der Schmelzpunkte können, gleiche Versuchsbedingungen vorausgesetzt, unbekannte DNA-Fragmente mit bekannten Sequenzen verglichen und zugeordnet werden. Diese Möglichkeit macht man sich bei der Detektion von SNPs zunutze.

Der Schmelzpunkt ist von der Länge des untersuchten DNA-Fragments und der Anzahl an den Basen Cytosin (C) und Guanin (G) abhängig. Je mehr C und G vorhanden ist, desto stabiler ist der DNA-Doppelstrang. Ebenso ist von Bedeutung, wie gut die beiden DNA-Stränge übereinstimmen. Wenn die Hybridisierungssonden zu 100% an die zu untersuchende DNA binden, erhält man einen höheren Schmelzpunkt, als wenn die Übereinstimmung nicht vollständig ist, da man eine höhere Temperatur benötigt um die Sonden abzulösen. Dies trifft z.B für eine Mutation eines Nukleotids zu.

Zur Detektion von SNPs verwendet man eine Sonde die zu 100% bindet, die sog. Anchor-Sonde, und eine zweite markierte Sensor-Sonde, die den Abschnitt mit der veränderten Sequenz umfasst. Man kann die Sensor-Sonde als Mutationssonde herstellen, dass heißt sie passt zu 100% zum DNA-Abschnitt der die Mutation trägt. Alternativ kann sie, wenn ihre Sequenz entsprechend gesucht wird, auch den Wildtyp detektieren. Die Sonden müssen wiederum so konstruiert sein, dass sie aneinander angrenzen damit der FRET stattfinden kann. Bei der anschließenden Schmelzkurvenanalyse erhält man eine eingipflige Kurve, falls die zu untersuchende DNA rein in Wildtypform vorliegt, oder sie homolog für die Mutation ist. Heterologe Allele lassen sich durch Schmelzkurven mit 2 Kurvenmaxima darstellen.

Wenn die Sensor-Sonde zur Wildtyp-Detektion fungiert, dann liegen bei der eingipfligen Kurve mit höherem Schmelzpunkt homologe Wildtyp-Allele vor, denn hier bindet die Sonde zu 100%. Die Kurve mit dem niedrigeren Schmelzpunkt deutet auf die homologe Mutation hin, denn hier bindet die Wildtyp-Sonde nicht zu 100% und löst sich schon bei geringerer Temperatur ab. Entsprechendes gilt, wenn eine den Nukleotidaustausch erkennende Sensor-Sonde eingesetzt wird [68].

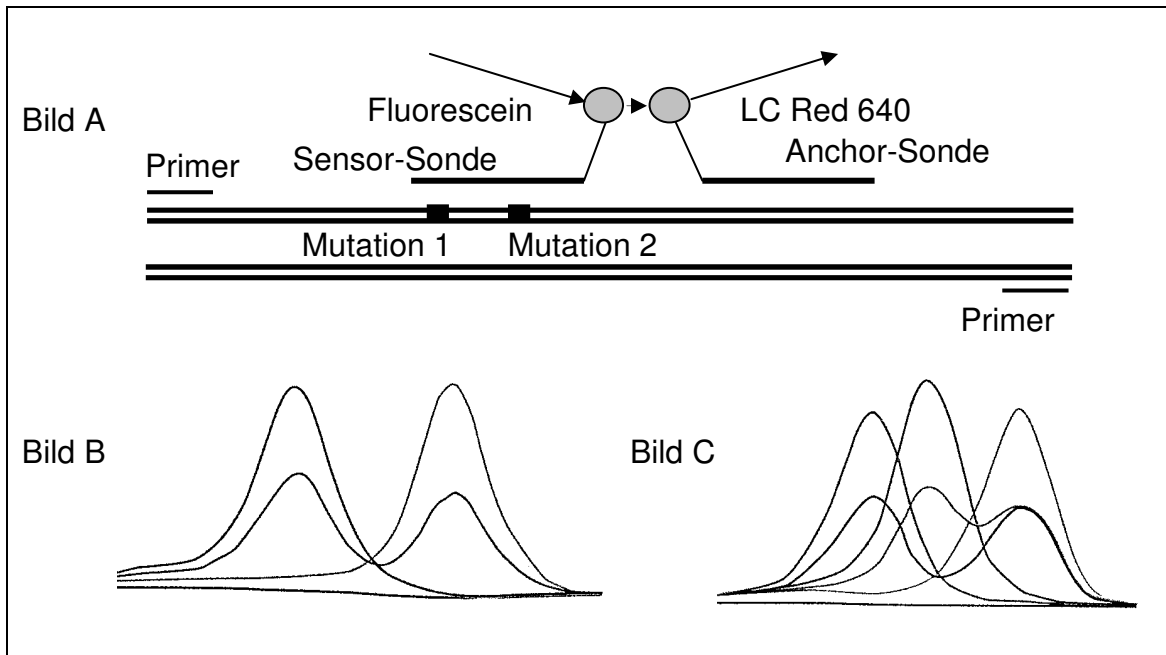


Abbildung 4 Analyse einer bzw. von zwei Mutationen mit einem Farbstoff (LC Red 640)

Bild B: Schmelzkurve für eine Mutation (Mutation 1 oder 2)

Bild C: Schmelzkurve für zwei Mutationen (Mutation 1 und 2)

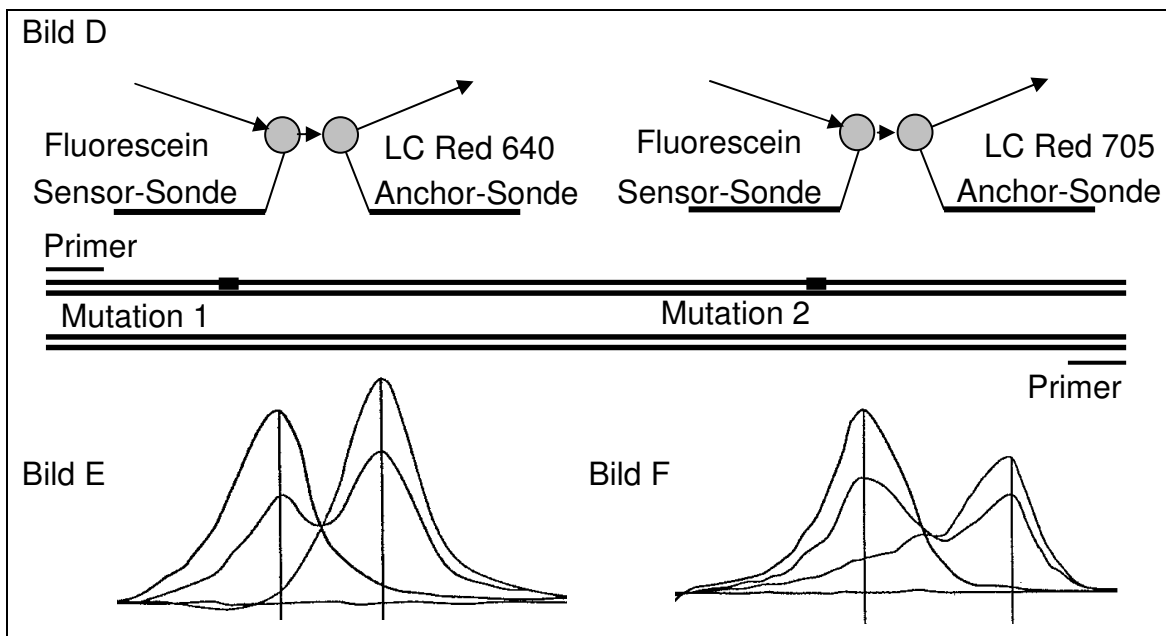


Abbildung 5 Analyse von zwei Mutationen mit zwei Farbstoffen (LC Red Red 640 und LC Red 705)

Die Schmelzkurven in Bild E und F sind in zwei verschiedenen Kanälen ausgewertet

2.3.1.6 Primer und Sonden Design

Nach Auswahl der SNPs in der NCBI-Datenbank [63], wurden die Primer und Sonden von TibMolibol hergestellt. Sie sind geblastet, das bedeutet ihre Sequenz wurde mit der Basenabfolge in anderen Organismen und mit anderen DNA-Abschnitten des humanen Genoms verglichen, um eine Amplifikation anderer Gene zu vermeiden.

Probeläufe zur gleichzeitigen Detektion von zwei Punktmutationen mit zwei verschiedenen Farbstoffen (LC Red 640 und LC Red 705) konnten aufgrund von Fluoreszenzüberlagerungen nicht richtig ausgewertet werden. Darum erfolgte in dieser Arbeit jeweils die Detektion eines SNPs.

Zu Beginn wurden weitere Testläufe mit verschiedenen Primern und Sonden durchgeführt. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Sequenzen.

Die Länge der Primer liegt zwischen 17 bp und 26 bp. Die Sonden sind zwischen 20bp und 30bp lang.

Die Schmelzpunkte der Sonden liegen im Durchschnitt um 12°C höher als die der Primer, damit eine Hybridisierung des DNA-Abschnitts mit den Sonden vor den Primern gewährleistet ist. Denn sobald sich die Primer an die DNA angelagert haben, beginnt die Amplifikation und die Zielsequenz der Sonden wäre maskiert.

Tabelle 3 Übersicht über die verwendeten Primer und Sonden

S = Sense/F = Forward (Vorwärtsprimer)
 A = Antisense/R = Reverse (Rückwärtsprimer)
 FL = Fluorescein markierte Sonde LC = LC Red 640 markiert
 Tm = Schmelztemperatur in °C (nach „2+4-Regel“: A/T Paar = 2°C,
 G/C = 4°C) M = mutationsspezifisch W = wildtypspezifisch

TLR und SNP	Oligonukleotide (5' → 3'-Richtung)	Tm (°C)
TLR3 rs3775291	F: GGAAGATAATGATATTCCAGGCAT	66,0
	R: GCAAAGGAGTTCCTAGTCAGC	64,0
	FL: TCTTGGTTAGGTTGAATATGTGTAAG-fluorescein →M	70,0
	LC: GAGAATGAGCAAGTGATACAAATGTTTCAT	80,0

TLR3 rs5743318	S: TTGAACTCTTTTTTCATGATCAATACC A: TGAAGAGAAATGTTCCCAGACC FL: AACTCGATGTACTGTAACATTCCA-fluorescein →W LC: TAAAAAGATATCCTCCAGCCCTCAAAGT	68,0 64,0 66,0 78,0
TLR9 rs352140	F: GCATCTCGCAGGCAGTCA R: CACGCCCTGCATGCCAA FL: TTCACGGAGCTACCACGACTG-fluorescein →W LC: GCCCTGGACCTCAGCTACAACAGCC	58,0 56,0 66,0 82,0
TLR9 rs5743842	F: AGGTAGGGCTTGGAGAGAGG R: AACAGCCAGTTGCAGTTCAC FL: GCTGCGGCAGAAACCCTGTG-fluorescein →W LC: GGTGGGAGGGCTGTGTGAGTGGCCG	64,0 60,0 66,0 86,0
TLR8 rs2407992	F: GAATTAGTTTTTCAGTGGCAATCG R: GAAGATGTAAAGTCAGATAGGCTA FL: GGGATGTGCTTCAGCCTATTAA-fluorescein →W LC: GGATAAATCCAGACGTGTCAGATTCTTG	64,0 66,0 64,0 80,0
TLR8 rs3747414	F: GTCTCGAGTTGCTTGACTTAC R: CATTGAGATGTTTCATCCATCCAT FL: ATCTGCTAAAAACAATCAACAAATCC-fluorescein →W LC: CACTTGAAACTAAGACCACCACCAAATTAT	62,0 64,0 68,0 82,0
TLR8 rs3764880	F: CATAGAGGGTACCATTCTGCG R: CCATTTATTACTTTCTAGGCTCA FL: GTGGCTTACCACGTTTCTGTTGT-fluorescein →M LC: CTAATTTTTTCATTCCGTAACCTTGCAGCAG	64,0 62,0 68,0 80,0
TLR8 rs5744077	F: GCAGCGCTGCTAATTTATTTAC R: GGGAACCTCCTGTAGTCGAC FL: AGTCGTCAATGCTGACCTGCATT-fluorescein →W LC: CCTGCTAATATCTGGTTCCTGTGAGTTATGCGCCGAAG	62,0 62,0 68,0 95,0

2.3.1.7 PCR Protokoll

Als Grundlage diene ein bereits in dieser Arbeitsgruppe etabliertes Protokoll, dass sich zur quantitativen Pilz-Diagnostik bewährt hat [52].

Zum Teil wurden Inkubationszeiten, Temperaturen und das Pipettierschema variiert.

Initialdenaturierung und

Aktivierung der Taq Polymerase: 9min bei 95 °C (20 °C/min)

Amplifikation

Denaturierung 9s bei 95 °C (20 °C/min)

Annealing-Phase 15s bei 54 °C (20 °C/min)

Extension 25s bei 72 °C (20 °C/min)

Schmelzkurvenanalyse

20s bei 95 °C (20 °C/min)

20s bei 40-50 °C (20 °C/min)

95 °C (0,1-0,2/min)

Cooling

3min bei 40 °C (20 °C/min)

Die PCR dauert für 32 Proben bei 45 (60) Zyklen ca. 55 (75) min.

Pipettierschema

Gesamtvolumen: 20µl pro Kapillare

zusammengesetzt aus

- 2µl DNA-Probe und 8µl H₂O steril
- 10µl Master Mix

Master Mix:

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
H ₂ O steril	2,6µl	-
MgCl ₂	2,4µl	4mM
Primer 1	0,5µl	0,125µM
Primer 2	0,5µl	0,125µM
Sonde 1	1,0µl	0,2µM
Sonde 2	1,0µl	0,2µM
FastStartTaq DNA Polymerase + PCR-Puffer + 10mM MgCl ₂ (10xconc.)	2,0µl	1x

Die FastStart Taq Polymerase basiert auf der Hot Start-Technologie, damit möglichst wenige unspezifische PCR-Produkte amplifiziert werden [42].

Die fertige Taq Polymerase konnte eine Woche bei 2-8°C, oder maximal 3 Monate bei -15°C bis -25°C gelagert werden. Einmal angesetzte Sonden konnten 1-3 Monate bei 4°C aufgehoben werden. Die Lagerung der Primer war bei -15 bis -25°C monatelang möglich. Häufiges Kühlen und Erwärmen sollten zur Sicherung einer gleichbleibend hohen Qualität der Primer vermieden werden.

2.4 Statistische Analyse

Die gewonnenen Daten wurden mit beschreibenden Parametern und mit statistischen Testverfahren analysiert.

Nach dem Vorbild einer klassischen Assoziationsanalyse nach dem Fall-Kontroll-Prinzip wird auf Assoziation zwischen den verschiedenen Allelen, an bestimmten Genorten, in der Fall- und Kontrollgruppe getestet.

Man vergleicht die Allelfrequenzen zwischen den reaktivierten (erkrankten) Fällen und den nicht reaktivierten (nicht erkrankten) Kontrollen.

Voraussetzung für einen Assoziationstest wie dem Allele-Frequenz-Differenz Test, der auf den Allelfrequenzen basiert, ist, dass die Allele zwischen den Individuen unabhängig sind, d.h. die Genotypfrequenzen befinden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE).

Das HWE besagt, dass die Häufigkeit der Homozygoten und Heterozygoten über Generationen hinweg konstant bleibt, wenn eine ideale Population vorliegt. Wenn die Genotypverteilung vom HWE abweicht, sind allel-basierte Tests nicht geeignet das wahre Ausmaß der Assoziation zu testen [72].

Alternativ kann man den Armitage's Trend Test verwenden. Er vergleicht die Genotypen miteinander und ist gegenüber Abweichungen vom HWE robust. Wenn sich die Population im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindet, sind beide Testverfahren asymptotisch gleich.

Ein besonderer Fall ist die Analyse für SNPs auf dem x-Chromosom:

Für männliche, hemizygote Individuen können nur Allelfrequenzen, nicht jedoch die Genotypfrequenzen bestimmt werden. Darum eignet sich für die Analyse der SNPs in TLR8 (x-Chromosom) nur der Allele-Frequenz-Differenz Test und nicht wie für die SNP-Analyse in TLR9 (Chromosom3) beide Testverfahren.

Als Alternative dient die Berechnung der odds ratio (Chancenverhältnis) mit den 95% Konfidenzintervallsgrenzen als Schätzung des relativen Risikos. Ein odds ratio >2 ist ein starker Hinweis auf das Vorliegen einer Assoziation.

2.4.1 Durchführung der Analysen

Jede einzelne Fall-Kontroll-Gruppe wurde zuerst auf HWE getestet. Zur graphischen Veranschaulichung eignet sich das De Finetti-Diagramm.

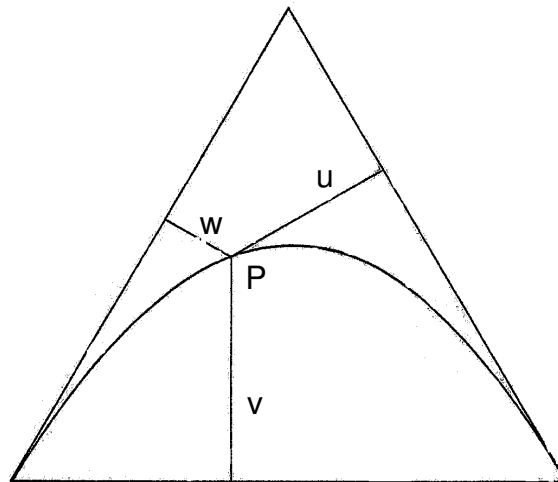


Abbildung 6 Gleichseitiges Dreieck mit den Loten u, v und w

Die Lote u' , v' und w' des gleichseitigen Dreiecks stellen das Verhältnis der Genotypen dar. Für die Genotypen $AA=u$, $Aa=v$ und $aa=w$ ist für eine stabile Genotypverteilung das Verhältnis $v^2=4uw$ gültig.

Dieses spiegelt das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wieder und ist als Parabel eingezeichnet. Wenn wie in der Abbildung 6 der Punkt P im HWE liegt, ist er auf der Parabel wiederzufinden [13].

Als Maß für die HWE-Abweichung dient der F-Wert (inbreeding factor)

$$F = 1 - (p(Aa)) / 2p(A) \times p(a)$$

$P(Aa)$ = Heterozygotenfrequenz, $p(A)$ = Allelfrequenz des Allels A und $p(a)$ = Allelfrequenz für das Allel a.

Umso größer der F-Wert ist, desto stärker ist die Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Ein negativer Betrag des F-Werts, bedeutet ein Heterozygotendefizit, ein positiver Betrag ein Heterozygotenüberschuss.

2.4.2 Armitage's Trend Test

Test auf Assoziation basierend auf der Genotypverteilung

Genotypverteilung

	0	1	2	Gesamtzahl
Fälle	r_0	r_1	r_2	R
Kontrollen	s_0	s_1	s_2	S
Gesamtzahl	n_0	n_1	n_2	N

Teststatistik für 2x3- Genotyptabelle [72].

$$\chi^2 = \frac{N(N(r_1 + 2r_2) - R(n_1 + 2n_2))^2}{R(N - R)(N(n_1 + 4n_2) - (n_1 + 2n_2)^2)}$$

Chi² verteilt mit einem Freiheitsgrad

2.4.3 Allele-Frequenz Differenz Test

Test auf Assoziation basierend auf Allelfrequenzen

Allelverteilung

	A	a	Gesamtzahl
Fälle	$r_1 + 2r_2$	$r_1 + 2r_0$	R
Kontrollen	$s_1 + 2s_2$	$s_1 + 2s_0$	S
Gesamtzahl	$n_1 + 2n_2$	$n_1 + 2n_0$	N

Teststatistik für 2x2- Genotyptabelle [72]

$$\chi^2 = \frac{2N(2N(r_1 + 2r_2) - 2R(n_1 + 2n_2))^2}{(2R)2(N - R)(2N(n_1 + 2n_2) - (n_1 + 2n_2)^2)}$$

Chi² verteilt mit einem Freiheitsgrad

2.4.4 Allelic Odds Ratio

	Allel 1	Allel 2
Fälle	a	b
Kontrollen	c	d

$$\text{Odds Ratio} = ad / bc$$

Bei kleiner Anzahl der Fälle bzw. Kontrollen wurde zusätzlich der p-Wert mit Hilfe des Exakten Tests nach Fisher berechnet.

2.4.5 Fisher's exakter Test:

Dieser Test beruht ebenso wie der Chi-Quadrat Test auf einer Vierfeldertafel und wird angewendet wenn die Felderbelegung sehr klein ist (a oder b oder c oder $d < 5$).

	X	Y	Spaltensumme
Fälle	a	b	a + b
Kontrollen	c	d	c + d
Zeilensumme	a + c	b + d	n = a + b + c + d

Die Vierfeldertafel wird so angeordnet, dass a der kleinsten Häufigkeit entspricht.

Man betrachtet sämtliche Vierfeldertafeln, die die gleichen Randsummen wie die ursprüngliche Tafel besitzen, mit der Frage ob die beobachtete Besetzung der Tafel oder eine noch weniger wahrscheinliche rein zufällig zustande kommt [70].

Die Analyse der klinischen Daten erfolgte ebenfalls mit χ^2 bzw. Fisher's exaktem Test und der Angabe der p-Werte, mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse mit LightCycler Technologie

3.1.1 Schmelzkurve und De Finetti Diagramme für TLR 9, rs 352140

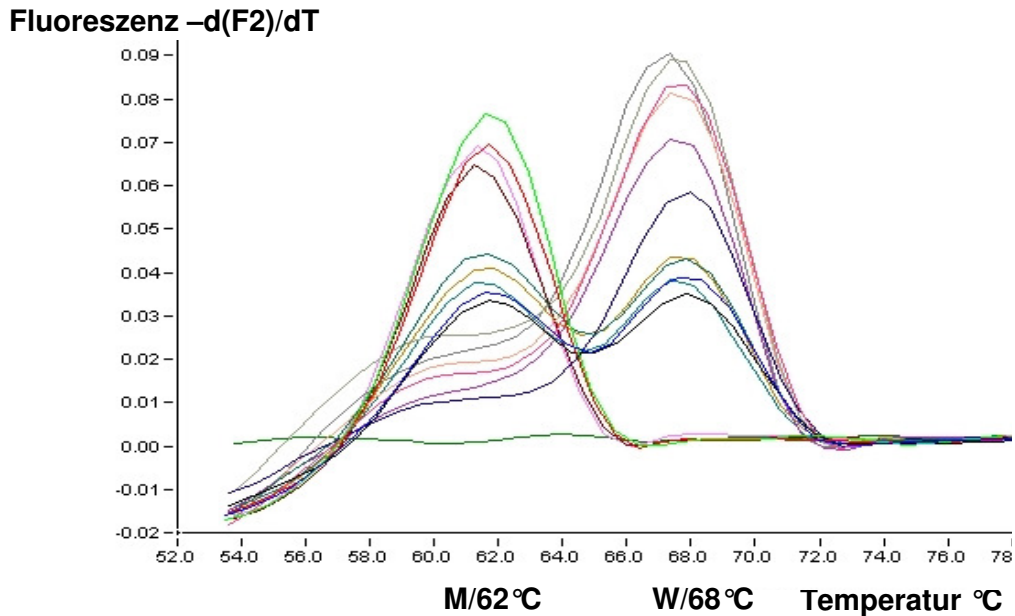


Abbildung 7 Darstellung der Schmelzkurve für TLR9, rs 352140

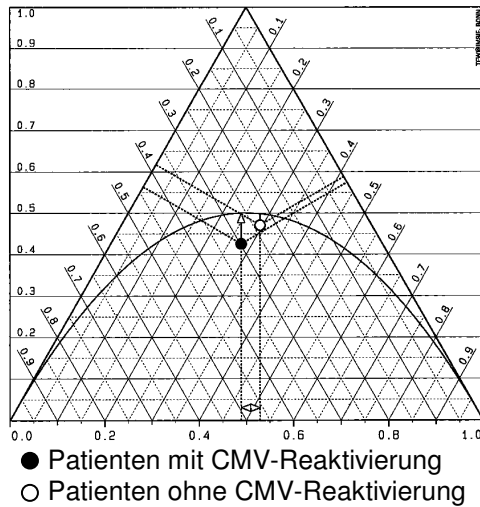
M = Mutation hat ihr Kurvenmaximum bei ca. 62°C

W = Wildtyp hat sein Kurvenmaximum bei ca. 68°C

Patienten	Wildtyp	Heterologe		Mutation
		Allele		
CMV nicht reaktiviert	15 ⇒29,4%	24 ⇒ 47,1%	12 ⇒23,5%	
CMV reaktiviert	26 ⇒27,7%	40 ⇒ 42,6%	28 ⇒29,7%	
CMV reaktiviert und erkrankt	9 ⇒36,0%	12 ⇒ 48,0%	4 ⇒16,0%	
CMV reaktiviert und nicht erkrankt	17 ⇒24,6%	28 ⇒ 40,6%	24 ⇒34,8%	

Darstellung der absoluten Werte und der Prozentwerte für den Wildtyp, die heterologe und homologe Mutation in den einzelnen Patientengruppen: CMV nicht reaktiviert, CMV reaktiviert, CMV erkrankt und an CMV nicht erkrankt.

De Finetti Diagramm:



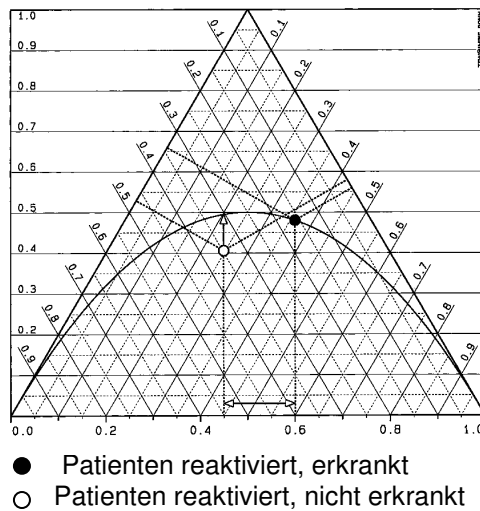
Ergebnisse der Assoziationsanalyse für den Vergleich CMV reaktiviert versus CMV nicht reaktiviert:

Armitage's Trend Test: $p(\chi^2) = 0,538$

Allele-Frequenz-

Differenz-Test: $p(\chi^2) = 0,515$

De Finetti Diagramm:



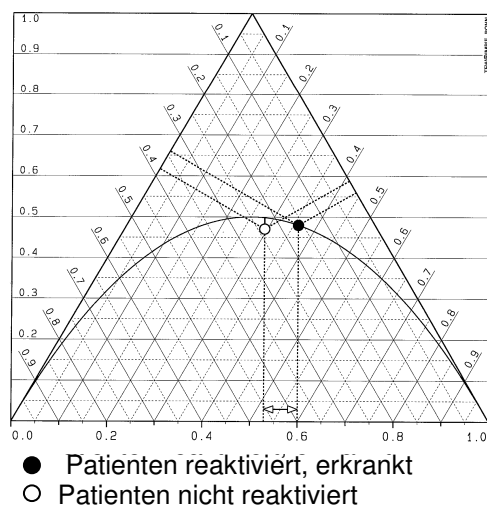
Ergebnisse der Assoziationsanalyse für den Vergleich CMV reaktiviert und erkrankt versus CMV reaktiviert und nicht erkrankt:

Armitage's Trend Test: $p(\chi^2) = 0,088$

Allele-Frequenz-

Differenz-Test: $p(\chi^2) = 0,068$

De Finetti Diagramm:



Ergebnisse der Assoziationsanalyse für den Vergleich CMV reaktiviert und erkrankt versus CMV nicht reaktiviert:

Armitage's Trend Test: $p(\chi^2) = 0,421$

Allele-Frequenz-

Differenz-Test: $p(\chi^2) = 0,411$

Zusammenfassung der Ergebnisse für TLR9, rs 352140

Für den Polymorphismus rs 352140 im TLR9-Gen gilt:

Mehr Patienten, die das Cytomegalievirus reaktiviert haben tragen im Vergleich zu Patienten, die das Virus nicht reaktiviert haben (29,7% zu 23,5%) den Polymorphismus, und mehr Patienten die reaktiviert haben und nicht erkrankt sind verglichen zur Anzahl der Patienten die an CMV erkrankt sind (34,8% zu 16,0%) tragen den SNP. Mit 34,8% ist die Gruppe der Individuen, die das Virus reaktivieren und nicht erkranken, der häufigste Träger dieser Punktmutation. Bezüglich der Assoziationsanalysen ergaben sich keine signifikanten p-Werte.

3.1.2 Ergebnisse für TLR 8, rs 2407992

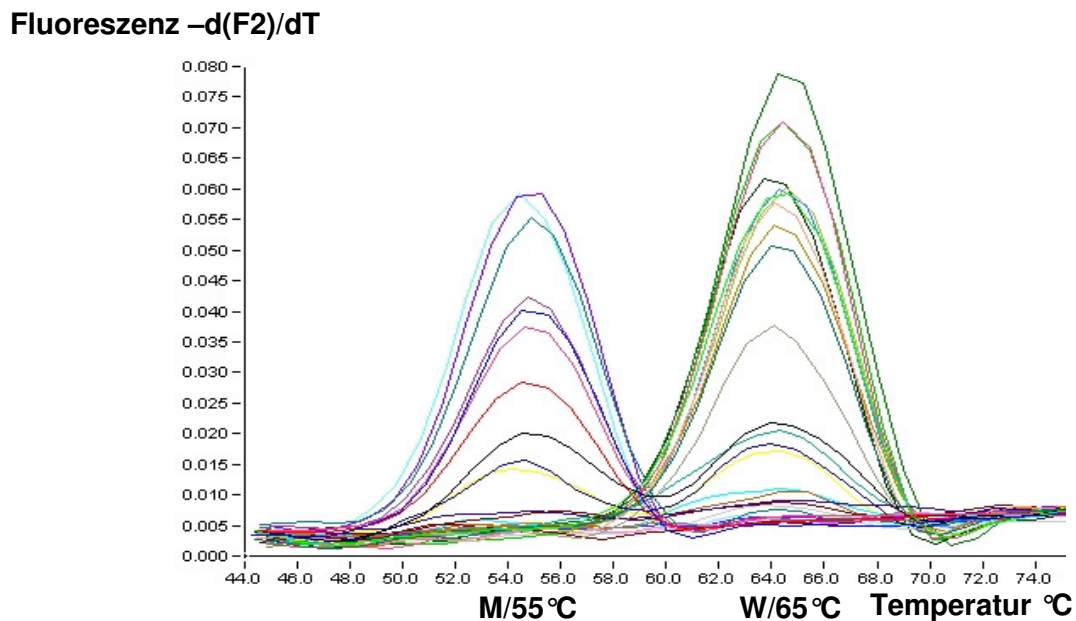


Abbildung 8 Darstellung der Schmelzkurve für TLR8, rs 2407992

M = Mutation hat ihr Kurvenmaximum bei ca. 55 °C

W = Wildtyp hat sein Kurvenmaximum bei ca. 65 °C

Patienten mit weiblichen Spendern	Wildtyp	Heterologe Allele	Mutation
CMV nicht reaktiviert	12⇒42,9%	11⇒ 39,3%	5⇒17,9%
CMV reaktiviert	11⇒42,3%	13⇒ 50,0%	2⇒ 7,7%
CMV reaktiviert und erkrankt	5⇒45,5%	4⇒ 36,4%	2⇒18,2%
CMV reaktiviert und nicht erkrankt	5⇒35,7%	9⇒ 64,3%	0⇒ 0,0%

Patienten mit männlichen Spendern	Wildtyp	Heterologe Allele	Mutation
CMV nicht reaktiviert	16⇒72,7%	0⇒ 0,0%	6⇒27,3%
CMV reaktiviert	45⇒68,2%	0⇒ 0,0%	21⇒31,8%
CMV reaktiviert und erkrankt	11⇒73,3%	0⇒ 0,0%	4⇒26,7%
CMV reaktiviert und nicht erkrankt	35⇒67,3%	0⇒ 0,0%	17⇒32,7%

Darstellung der absoluten Werte und der Prozentwerte für den Wildtyp, die heterologe und homologe Mutation in den einzelnen Patientengruppen, nach Spendergeschlecht aufgeteilt.

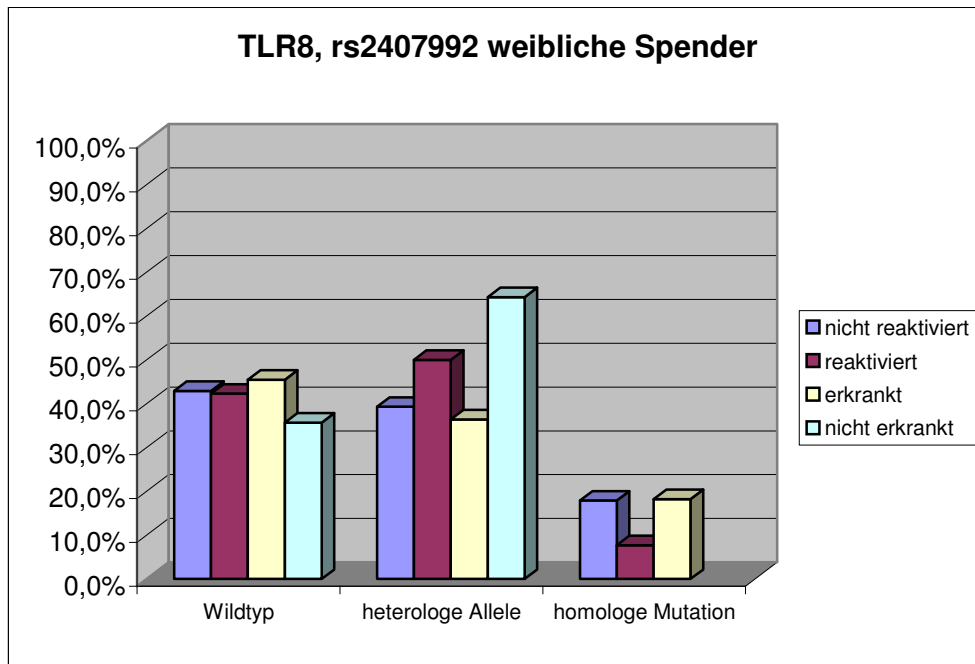


Abbildung 9 Prozentualer Anteil der Allele für die einzelnen Patientengruppen mit weiblichen Spendern, rs 2407992

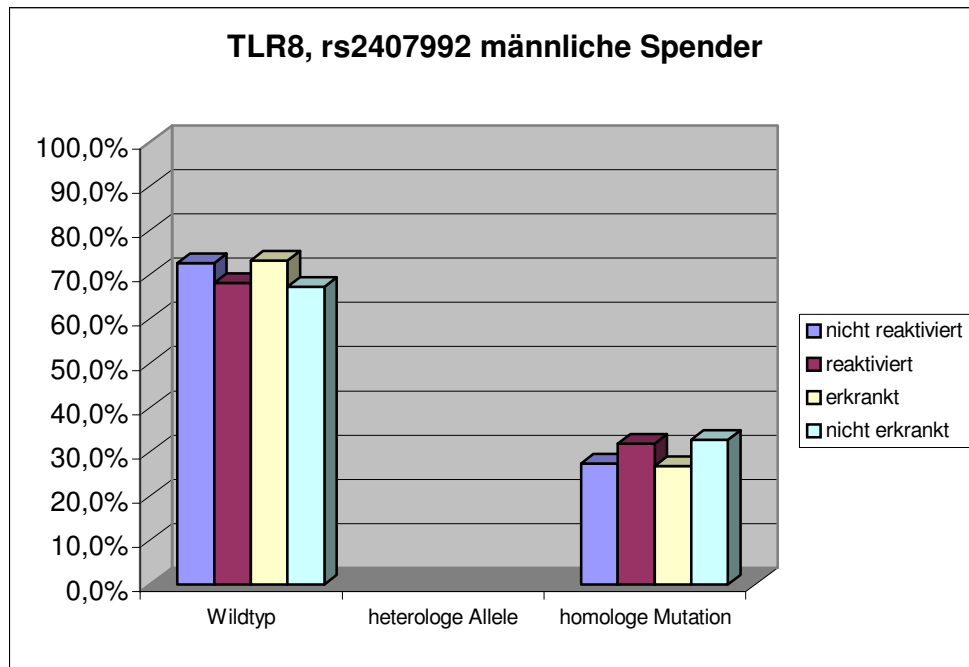


Abbildung 10 Prozentualer Anteil der Allele für die einzelnen Patientengruppen mit männlichen Spendern, rs 2407992

Ergebnisse der Assoziationsanalysen für TLR8, rs 2407992

1. für weibliche Spender

Patienten mit weiblichen Spendern	Allele-Frequenz-Differenz-Test	Allelic Odds Ratio
CMV nicht reaktiviert verglichen mit CMV reaktiviert	$p(\text{chi}^2) = 0,912$	0,948
CMV reaktiviert und erkrankt verglichen mit CMV reaktiviert und nicht erkrankt	$p(\text{chi}^2) = 0,394$	1,778
CMV nicht reaktiviert verglichen mit CMV reaktiviert und erkrankt	$p(\text{chi}^2) = 0,654$	1,316

2. für männliche Spender

Patienten mit männlichen Spendern	Allele-Frequenz-Differenz-Test	Allelic Odds Ratio
CMV nicht reaktiviert verglichen mit CMV reaktiviert	$p(\text{chi}^2) = 0,688$	1,221
CMV reaktiviert und erkrankt verglichen mit CMV reaktiviert und nicht erkrankt	$p(\text{fisher}) = 0,174$	0,478
CMV nicht reaktiviert verglichen mit CMV reaktiviert und erkrankt	$p(\text{fisher}) = 0,425$	0,697

Zusammenfassung der Ergebnisse für TLR8, rs 2407992

Für den Polymorphismus rs 2407992 im TLR8-Gen und männliche Spender (Abb. 10) gilt:

Mehr Patienten, die das Cytomegalievirus reaktiviert haben tragen im Vergleich zu Patienten, die das Virus nicht reaktiviert haben (31,8% zu 27,3%) den Polymorphismus, und mehr Patienten die reaktiviert haben und nicht erkrankt sind verglichen zur Anzahl der Patienten die an CMV erkrankt sind (32,7% zu 26,7%) tragen den SNP. Die Gruppe der Individuen, die das Virus reaktivieren und nicht erkranken ist mit 32,7%, der häufigste Träger dieser Punktmutation. Bezüglich der Assoziationsanalysen ergaben sich keine signifikanten p-Werte.

Für den Polymorphismus rs 2407992 im TLR8-Gen und weibliche Spender (Abb. 9) gilt:

Mehr als doppelt so viele Individuen, die nicht reaktiviert haben (17,9% zu 7,7%), sind Träger der Mutation. Mit 18,2% zu 0% tragen die Patienten mit weiblichen Spendern und Erkrankung am Cytomegalievirus deutlich häufiger den Polymorphismus als Patienten ohne CMV-Erkrankung. Mit 18,2% ist die Gruppe der erkrankten häufigster Träger dieser Punktmutation. Bezüglich der Assoziationsanalysen ergaben sich keine signifikanten p-Werte.

3.1.3 Ergebnisse für TLR 8, rs 3747414

Fluoreszenz $-d(F2)/dT$

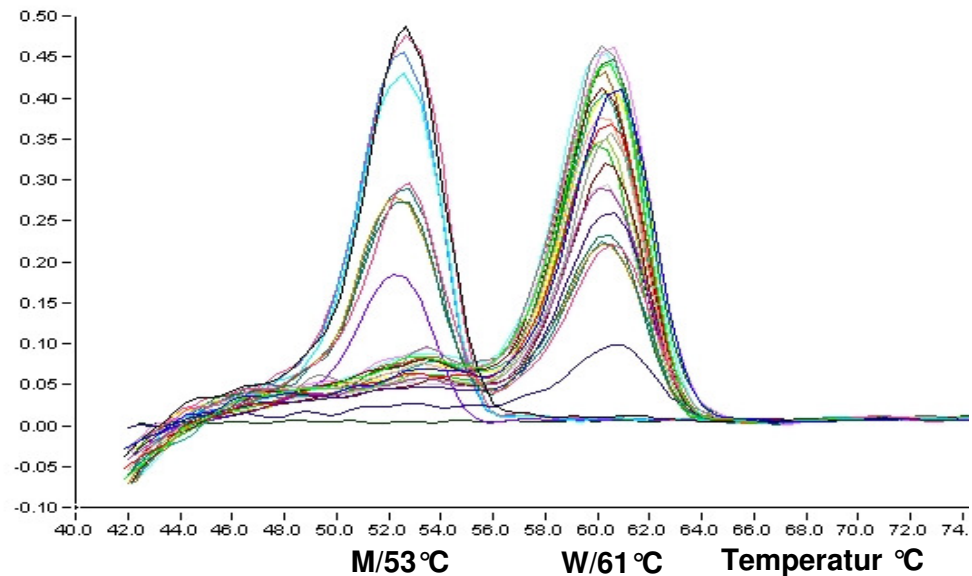


Abbildung 11 Darstellung der Schmelzkurve für TLR8, rs 3747414

M = Mutation hat ihr Kurvenmaximum bei ca. 53 °C

W = Wildtyp hat sein Kurvenmaximum bei ca. 61 °C

Patienten mit weiblichen Spendern	Wildtyp	Heterologe Allele	Mutation
CMV nicht reaktiviert	15⇒53,6%	7⇒ 25,0%	6⇒21,4%
CMV reaktiviert	14⇒50,0%	12⇒ 42,9%	2⇒ 7,1%
CMV reaktiviert und erkrankt	6⇒54,5%	4⇒ 36,4%	1⇒ 9,1%
CMV reaktiviert und nicht erkrankt	7⇒43,8%	8⇒ 50,0%	1⇒ 6,3%

Patienten mit männlichen Spendern	Wildtyp	Heterologe Allele	Mutation
CMV nicht reaktiviert	19⇒86,4%	0⇒ 0,0%	3⇒13,6%
CMV reaktiviert	49⇒73,1%	0⇒ 0,0%	18⇒26,9%
CMV reaktiviert und erkrankt	13⇒86,7%	0⇒ 0,0%	2⇒13,3%
CMV reaktiviert und nicht erkrankt	37⇒69,8%	0⇒ 0,0%	16⇒30,2%

Darstellung der absoluten Werte und der Prozentwerte für den Wildtyp, die heterologe und homologe Mutation in den einzelnen Patientengruppen, nach Spendergeschlecht aufgeteilt.

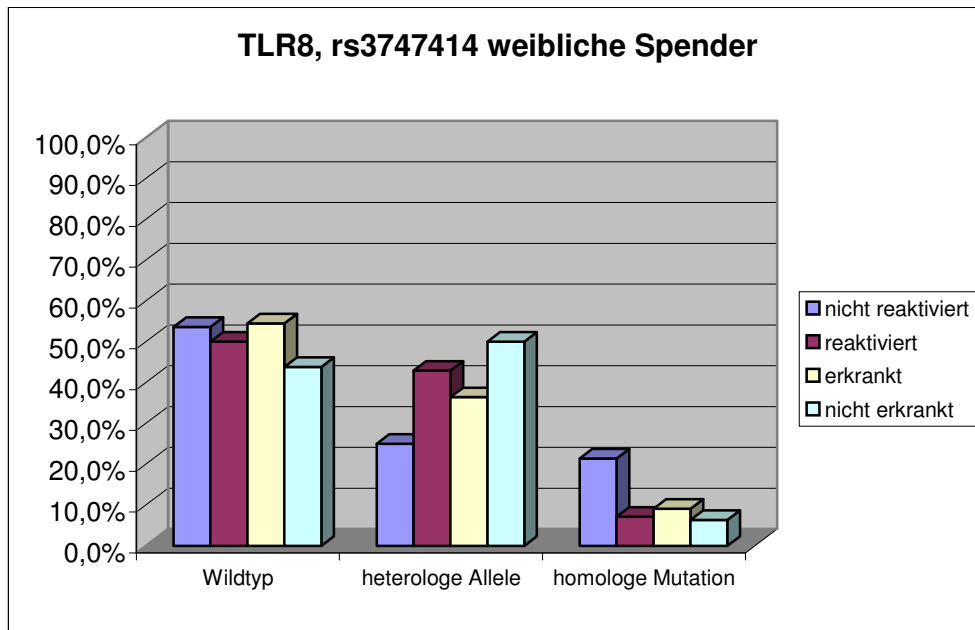


Abbildung 12 Prozentualer Anteil der Allele für die einzelnen Patientengruppen mit weiblichen Spendern, rs 3747414

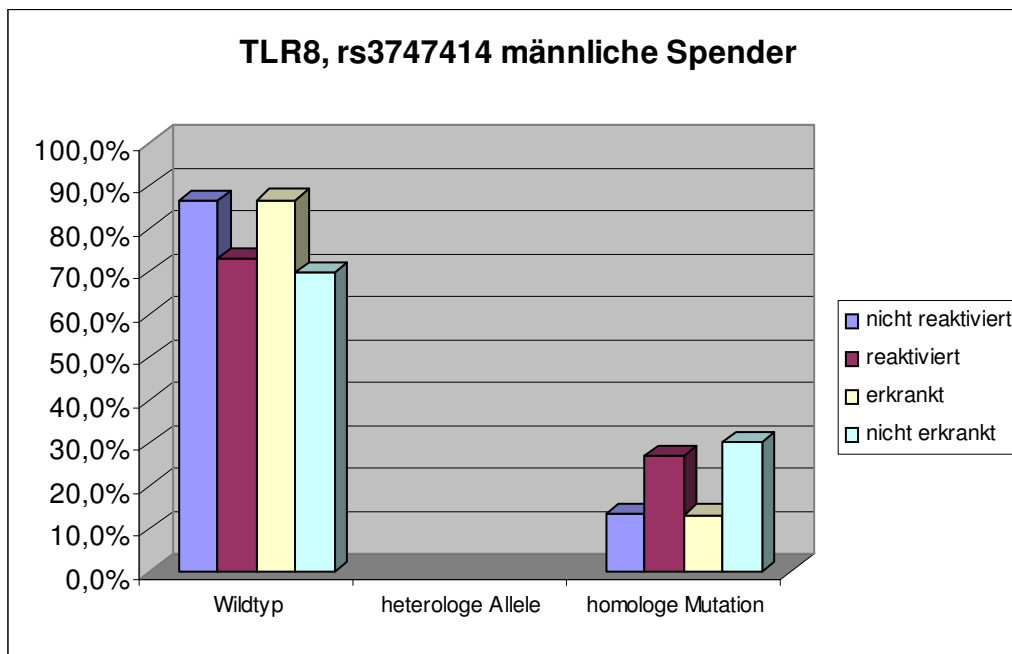


Abbildung 13 Prozentualer Anteil der Allele für die einzelnen Patientengruppen mit männlichen Spendern, rs 3747414

Ergebnisse der Assoziationsanalysen für TLR8, rs 3747414

1. für weibliche Spender

Patienten mit weiblichen Spendern	Allele-Frequenz-Differenz-Test	Allelic Odds Ratio
CMV nicht reaktiviert verglichen mit CMV reaktiviert	$p(\text{chi}^2) = 0,474$	1,410
CMV reaktiviert und erkrankt verglichen mit CMV reaktiviert und nicht erkrankt	$p(\text{fisher}) = 0,719$	0,856
CMV nicht reaktiviert verglichen mit CMV reaktiviert und erkrankt	$p(\text{fisher}) = 0,473$	1,283

2. für männliche Spender

Patienten mit männlichen Spendern	Allele-Frequenz-Differenz-Test	Allelic Odds Ratio
CMV nicht reaktiviert verglichen mit CMV reaktiviert	$p(\text{fisher}) = 0,090$	0,364
CMV reaktiviert und erkrankt verglichen mit CMV reaktiviert und nicht erkrankt	$p(\text{fisher}) = 0,039$	4,304
CMV nicht reaktiviert verglichen mit CMV reaktiviert und erkrankt	$p(\text{fisher}) = 0,608$	1,227

Zusammenfassung der Ergebnisse für TLR8, rs 3747414

Für den Polymorphismus rs 3747414 im TLR8-Gen und männliche Spender (Abb. 13) gilt:

Mehr Patienten, die das Cytomegalievirus reaktiviert haben tragen im Vergleich zu Patienten, die das Virus nicht reaktiviert haben (26,9% zu 13,6%) den Polymorphismus, und mehr Patienten die reaktiviert haben und nicht erkrankt sind verglichen zur Anzahl der Patienten die an CMV erkrankt sind (30,2% zu 13,3%) tragen den SNP. Wiederum ist mit 30,2% ist die Gruppe der Individuen, die das Virus reaktivieren und nicht erkranken, der häufigste Träger dieser Punktmutation. Im Allele-Frequenz-Test ergab sich für den Vergleich CMV reaktiviert und erkrankt und CMV reaktiviert und nicht erkrankt ein signifikanter p-Wert von 0,039.

Für den Polymorphismus rs 3747414 im TLR8-Gen und weibliche Spender (Abb. 12) gilt:

Mehr als dreimal so viele Individuen, die nicht reaktiviert haben (21,4% zu 7,1%), sind Träger der Mutation. Mit 9,1% zu 6,3% besitzen die Patienten mit weiblichen Spendern und Erkrankung am Cytomegalievirus häufiger den Polymorphismus als Patienten ohne CMV-Erkrankung. Die Gruppe der nicht reaktivierten ist mit 21,4% häufigster Träger dieser Punktmutation. Bezüglich der Assoziationsanalysen ergaben sich keine signifikanten p-Werte.

Für drei Personen ergaben sich bei der Schmelzkurvenanalyse von TLR8, rs 3747414 Kurven mit einem zusätzlichen Maximum bei ca. 47°C. Die Schmelzkurven sind in den zwei folgenden Abbildungen dargestellt:

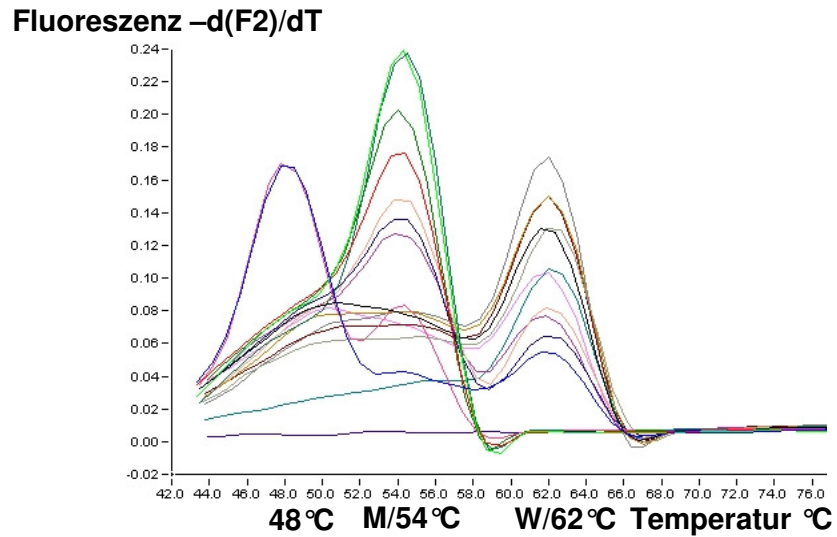


Abbildung 14 Darstellung der Schmelzkurve für TLR8 I , rs 3747414
M = Mutation hat ihr Kurvenmaximum bei ca. 54°C
W = Wildtyp hat sein Kurvenmaximum bei ca. 62°C
A = Austausch mit Kurvenmaximum bei ca. 48°C

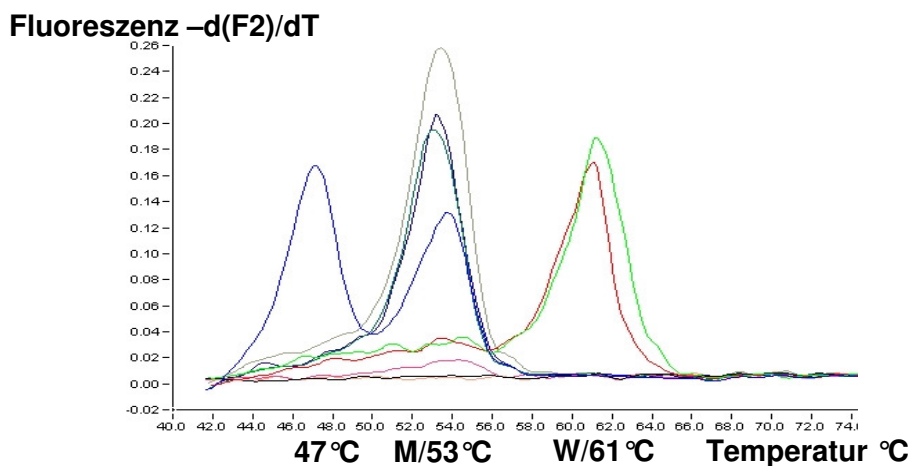


Abbildung 15 Darstellung der Schmelzkurve für TLR8 II , rs 3747414
M = Mutation hat ihr Kurvenmaximum bei ca. 53°C
W = Wildtyp hat sein Kurvenmaximum bei ca. 61°C
A = Austausch mit Kurvenmaximum bei ca. 47°C

3.1.4 Ergebnisse für TLR 8, rs 3764880

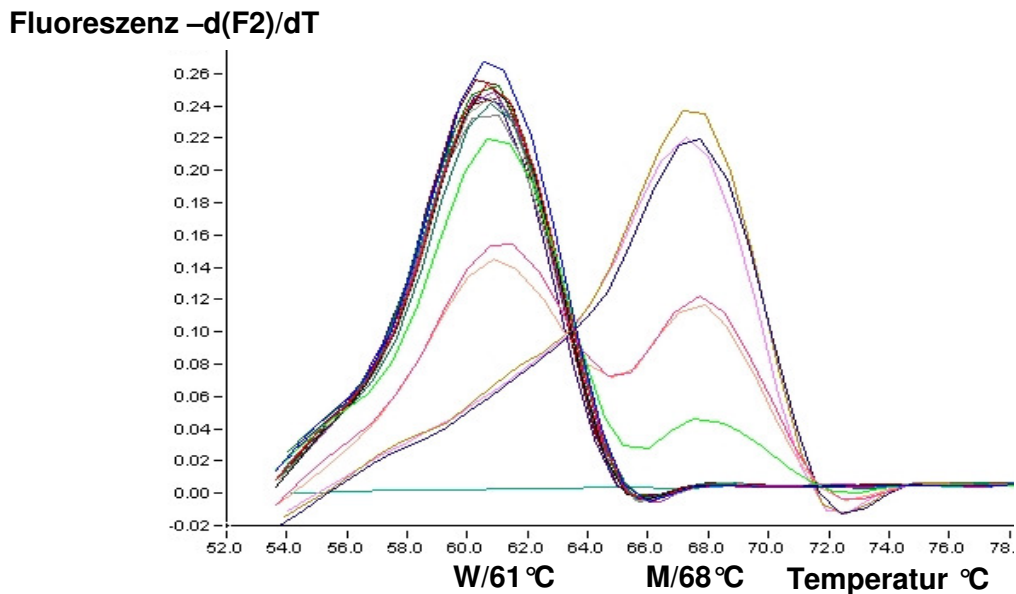


Abbildung 16 Darstellung der Schmelzkurve für TLR8, rs 3764880

M = Mutation hat ihr Kurvenmaximum bei ca. 68°C

W = Wildtyp hat sein Kurvenmaximum bei ca. 61°C

Patienten mit weiblichen Spendern	Wildtyp	Heterologe Allele	Mutation
CMV nicht reaktiviert	18⇒64,3%	8⇒ 28,6%	2⇒ 7,1%
CMV reaktiviert	17⇒60,7%	9⇒ 32,1%	2⇒ 7,1%
CMV reaktiviert und erkrankt	6⇒54,5%	4⇒ 36,4%	1⇒ 9,1%
CMV reaktiviert und nicht erkrankt	10⇒62,5%	5⇒ 31,3%	1⇒ 6,2%

Patienten mit männlichen Spendern	Wildtyp	Heterologe Allele	Mutation
CMV nicht reaktiviert	20⇒87,0%	1⇒ 4,3%	2⇒ 8,7%
CMV reaktiviert	50⇒76,9%	0⇒ 0,0%	15⇒23,1%
CMV reaktiviert und erkrankt	13⇒86,7%	0⇒ 0,0%	2⇒13,3%
CMV reaktiviert und nicht erkrankt	38⇒74,5%	0⇒ 0,0%	13⇒25,5%

Darstellung der absoluten Werte und der Prozentwerte für den Wildtyp, die heterologe und homologe Mutation in den einzelnen Patientengruppen, nach Spendergeschlecht aufgeteilt.

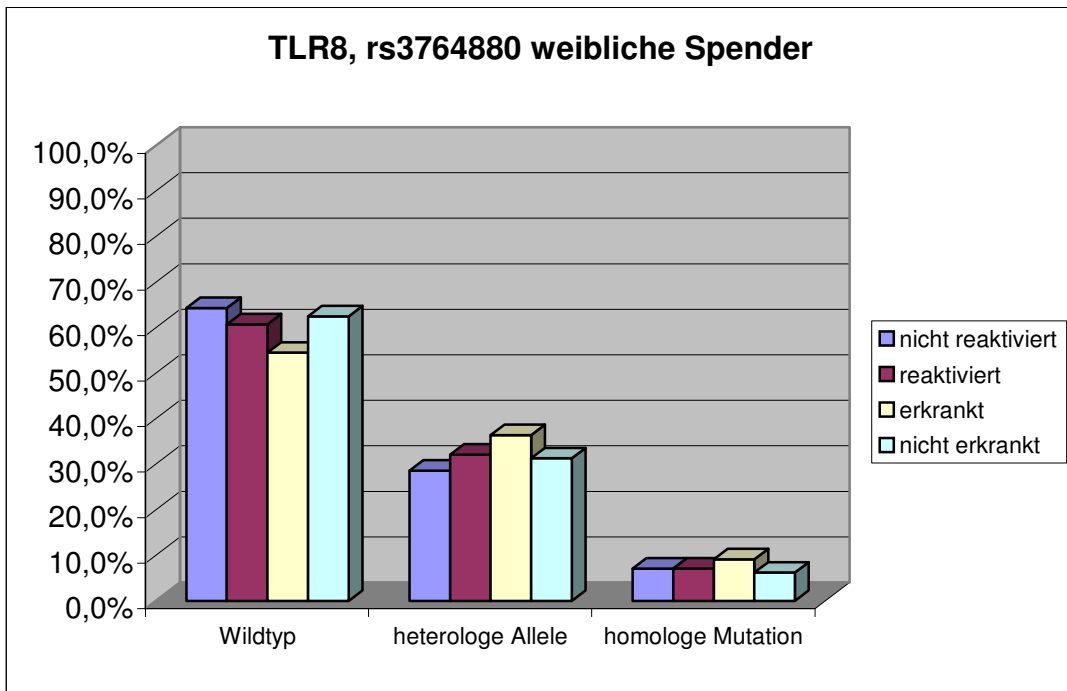


Abbildung 17 Prozentualer Anteil der Allele für die einzelnen Patientengruppen mit weiblichen Spendern, rs 3764880

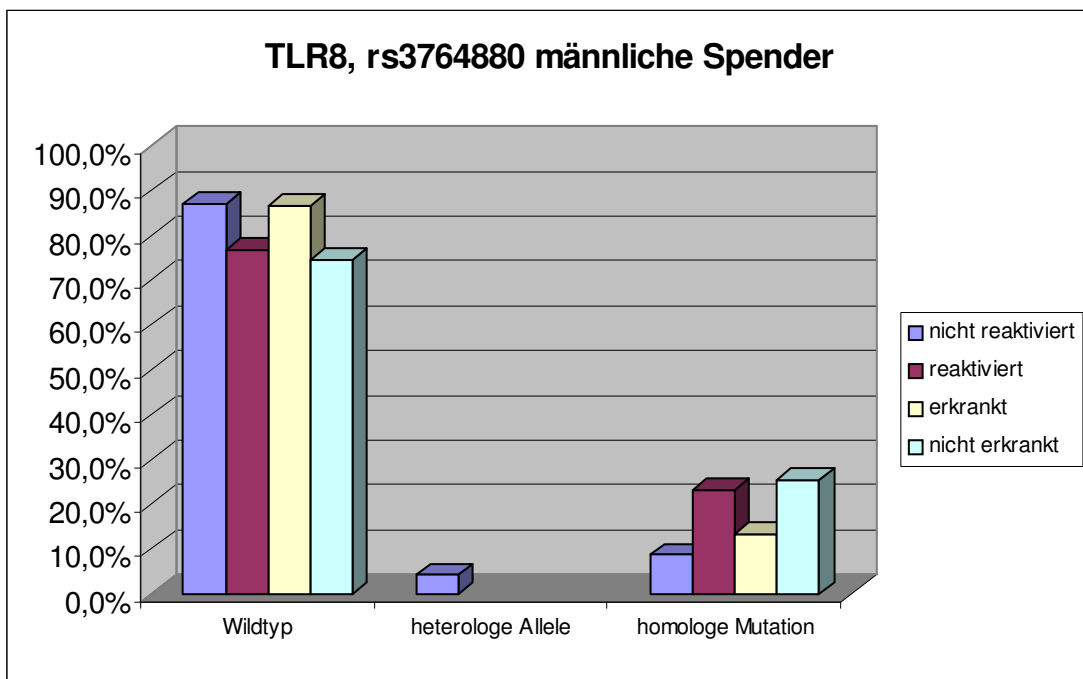


Abbildung 18 Prozentualer Anteil der Allele für die einzelnen Patientengruppen mit männlichen Spendern, rs 3764880

Ergebnisse der Assoziationsanalysen für TLR8, rs 3746880

1. für weibliche Spender

Patienten mit weiblichen Spendern	Allele-Frequenz-Differenz-Test	Allelic Odds Ratio
CMV nicht reaktiviert verglichen mit CMV reaktiviert	p(chi ²) = 0,523	1,452
CMV reaktiviert und erkrankt verglichen mit CMV reaktiviert und nicht erkrankt	p(fisher) = 0,811	1,455
CMV nicht reaktiviert verglichen mit CMV reaktiviert und erkrankt	p(fisher) = 0,884	1,818

2. für männliche Spender

Patienten mit männlichen Spendern	Allele-Frequenz-Differenz-Test	Allelic Odds Ratio
CMV nicht reaktiviert verglichen mit CMV reaktiviert	p(fisher) = 0,050	3,877
CMV reaktiviert und erkrankt verglichen mit CMV reaktiviert und nicht erkrankt	p(fisher) = 0,419	0,721
CMV nicht reaktiviert verglichen mit CMV reaktiviert und erkrankt	p(fisher) = 0,215	3,000

Zusammenfassung der Ergebnisse für TLR8, rs 3764880:

Für den Polymorphismus rs 3764880 im TLR8-Gen und männliche Spender (Abb. 18) gilt:

Mehr Patienten, die das Cytomegalievirus reaktiviert haben tragen im Vergleich zu Patienten, die das Virus nicht reaktiviert haben (23,1% zu 8,7%) den Polymorphismus, und mehr Patienten die reaktiviert haben und nicht erkrankt sind verglichen zur Anzahl der Patienten die an CMV erkrankt sind (25,5% zu 13,3%) tragen den SNP. Wiederum ist mit 25,5% die Gruppe der Individuen, die das Virus reaktivieren und nicht erkranken, der häufigste Träger dieser Punktmutation. Im Allele-Frequenz-Test ergab sich für den Vergleich CMV reaktiviert und CMV nicht reaktiviert ein p-Wert von 0,050.

Für den Polymorphismus rs 3764880 im TLR8-Gen und weibliche Spender (Abb. 17) gilt:

Gleich viele Individuen, die reaktiviert bzw. die nicht reaktiviert haben (7,1%), sind Träger der Mutation. Mit 9,1% zu 6,2% tragen die Patienten mit weiblichen Spendern und Erkrankung am Cytomegalievirus häufiger den Polymorphismus als Patienten ohne CMV-Erkrankung. Die Gruppe der Patienten mit Reaktivierung und Erkrankung ist mit 9,1% der häufigste Träger dieser Punktmutation. Bezüglich der Assoziationsanalysen ergaben sich keine signifikanten p-Werte.

Da sich für die folgend untersuchten SNPs (Abbildung 19 bis 22) keine Unterschiede in den einzelnen Gruppen ergaben, bzw. nur der Wildtyp detektiert werden konnte, wurden nur 50 bis 80 statt 146 Proben untersucht und es erfolgte keine Assoziationsanalyse.

Fluoreszenz $-d(F2)/dT$

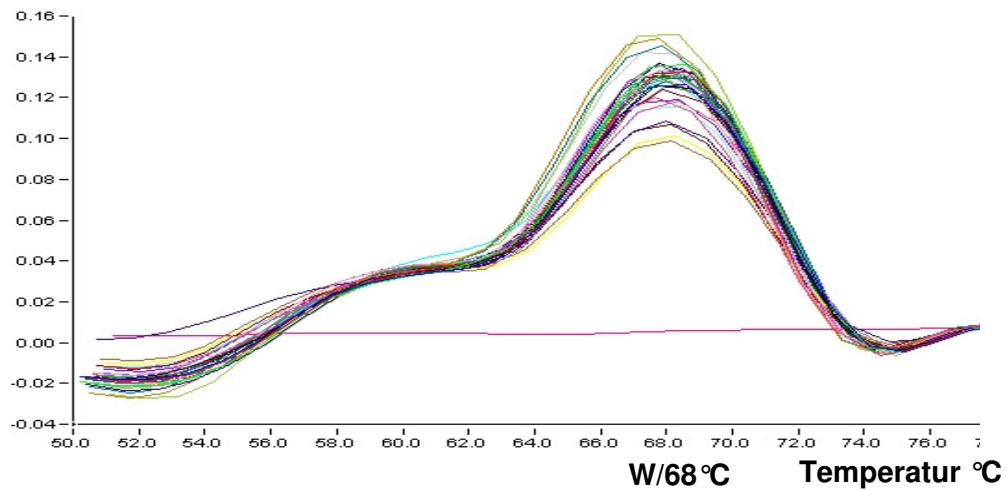


Abbildung 19 Darstellung der Schmelzkurve für TLR8, rs 574077
W = Wildtyp hat sein Kurvenmaximum bei ca. 68°C

Fluoreszenz $-d(F2)/dT$

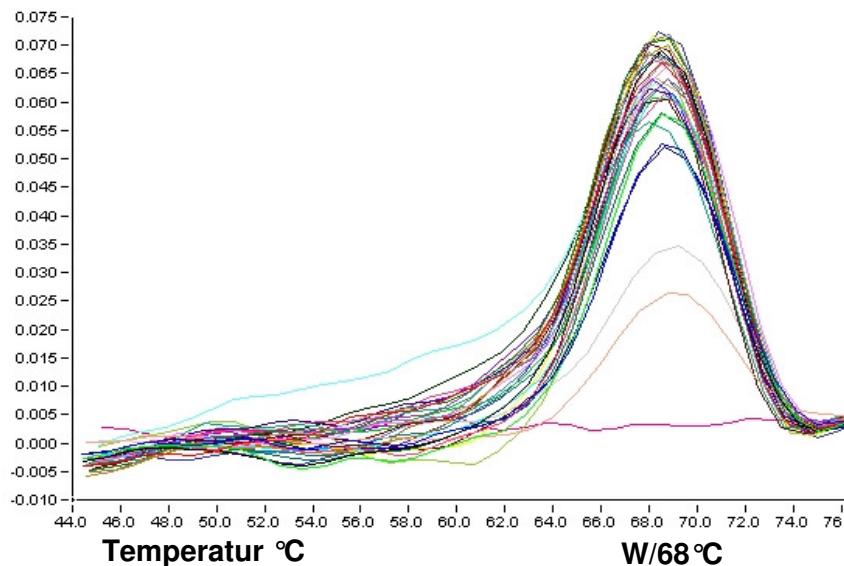


Abbildung 20 Darstellung der Schmelzkurve für TLR9, rs 5743842
W = Wildtyp hat sein Kurvenmaximum bei ca. 68°C

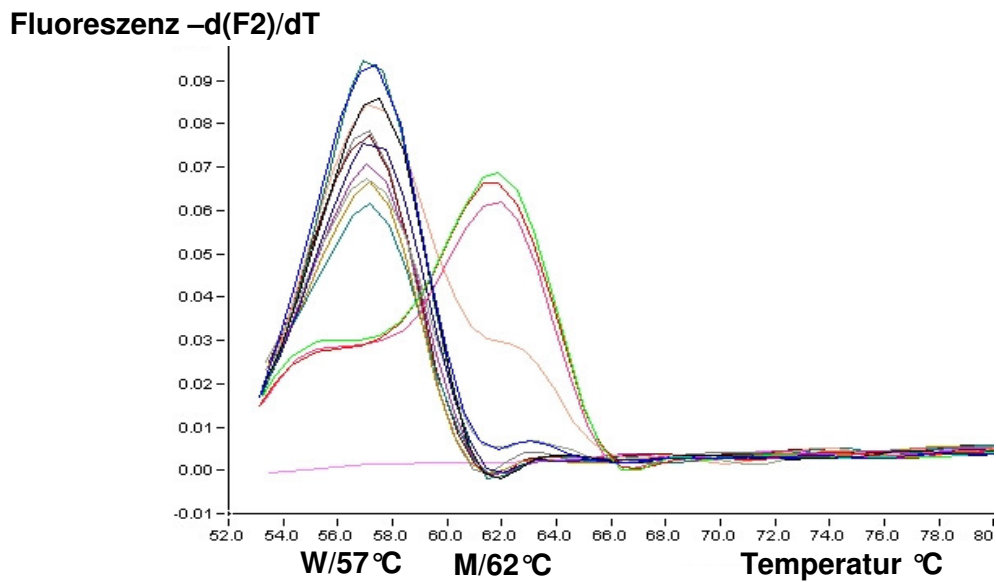


Abbildung 21 Darstellung der Schmelzkurve für TLR3, rs 3775291
 W = Wildtyp hat sein Kurvenmaximum bei ca. 57 °C
 M = Mutation hat ihr Kurvenmaximum bei ca. 62 °C

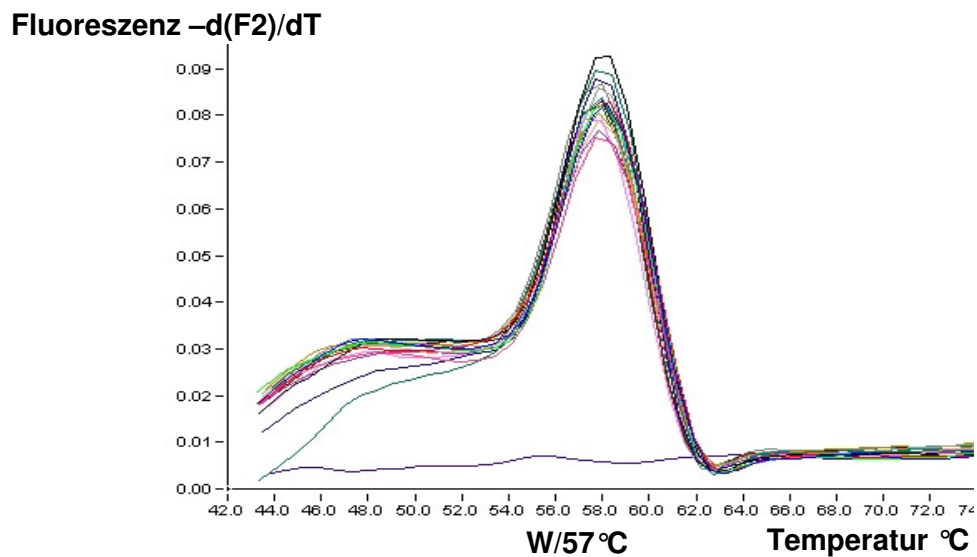


Abbildung 22 Darstellung der Schmelzkurve für TLR3, rs 5743318
 W = Wildtyp hat sein Kurvenmaximum bei ca. 57 °C

3.2 Ergebnisse der Analyse der klinischen Parameter

3.2.1 Vergleich CMV-Serologie

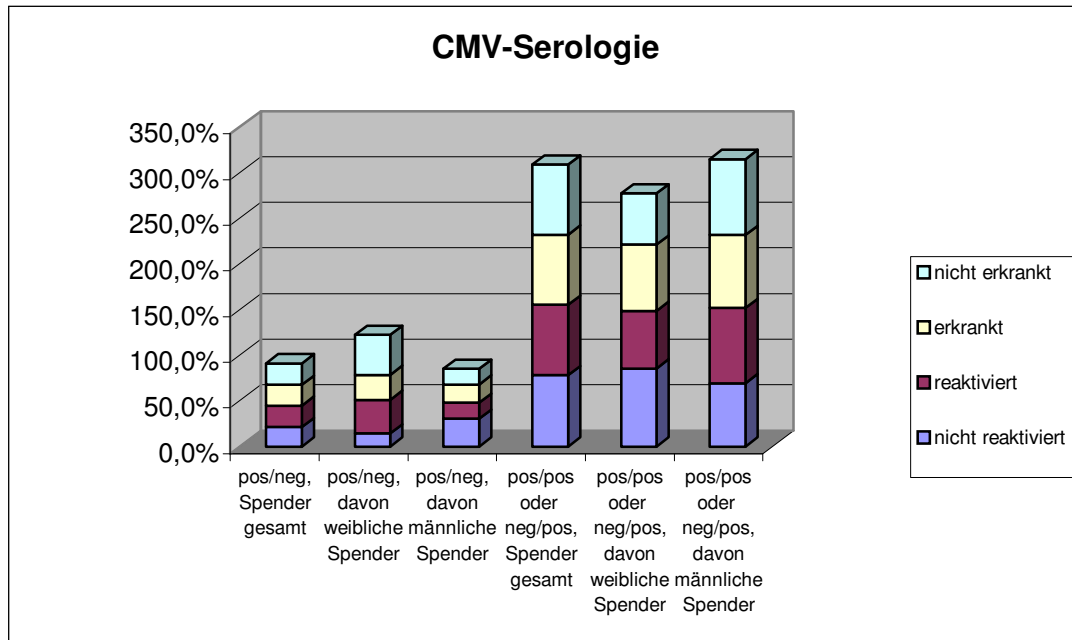


Abbildung 23 Prozentualer Anteil der Verteilung der CMV-Serologie für alle Patienten

Vergleich der CMV-Serologie (Prozentwerte im Anhang Tabelle 11)

Empfänger: positiv und Spender: negativ verglichen mit

Empfänger: positiv oder negativ und Spender: positiv

Patienten	Patienten gesamt	Patienten mit weiblichen Spendern	Patienten mit männlichen Spendern
CMV reaktiviert verglichen mit CMV nicht reaktiviert	p(chi ²)=0,991	p(fisher)=0,068	p(fisher)=0,237
CMV reaktiviert und erkrankt verglichen mit CMV reaktiviert und nicht erkrankt	p(chi ²)=0,889	p(fisher)=0,448	p(fisher)=0,719
CMV nicht reaktiviert verglichen mit CMV reaktiviert und erkrankt	p(chi ²)=0,794	p(fisher)=0,379	p(fisher)=0,709

3.2.2 Vergleich der Transplantationsmodalität

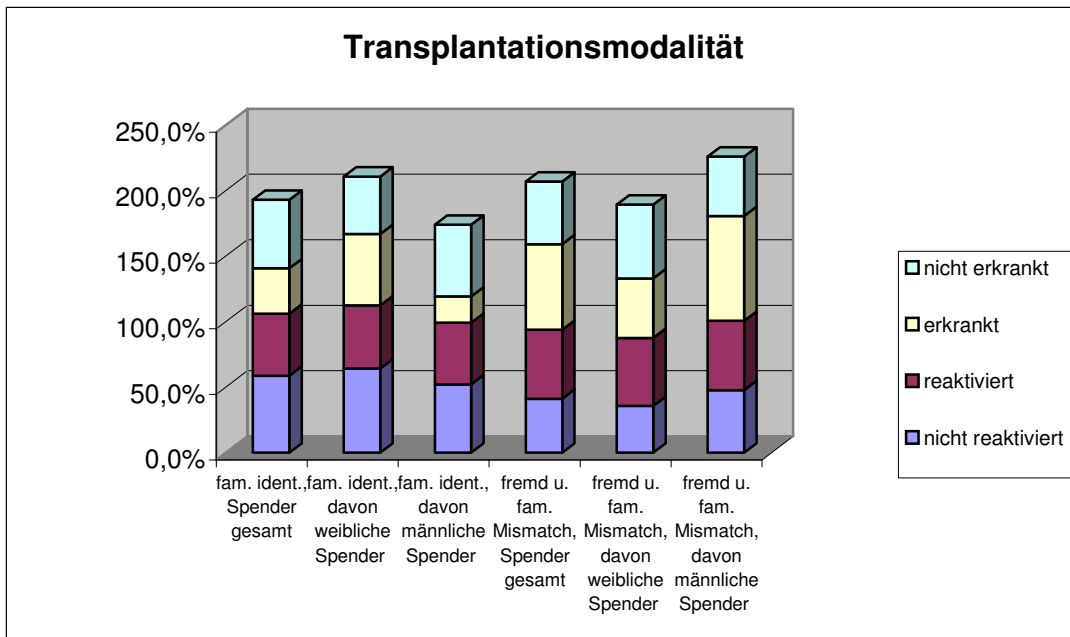


Abbildung 24 Prozentualer Anteil der Verteilung der Transplantationsmodalität für alle Patienten
fam. = familiär ident. = identisch

Vergleich der Transplantationsmodalität (Prozentwerte im Anhang Tab. 11)
Patienten mit verwandtem und HLA-identischem Spender (fam. ident.) verglichen mit Patienten mit unverwandtem Spender oder mit verwandtem Spender und mismatch (fremd, fam. mismatch)

Patienten	Patienten gesamt	Patienten mit weiblichen Spendern	Patienten mit männlichen Spendern
CMV reaktiviert verglichen mit CMV nicht reaktiviert	p(chi²)=0,252	p(chi²)=0,350	p(chi²)=0,855
CMV reaktiviert und erkrankt verglichen mit CMV reaktiviert und nicht erkrankt	p(chi²)=0,194	p(chi²)=0,873	p(chi²)=0,037
CMV nicht reaktiviert verglichen mit CMV reaktiviert und erkrankt	p(chi²)=0,077	p(fisher)=0,718	p(chi²)=0,088

3.2.3 Konditionierung

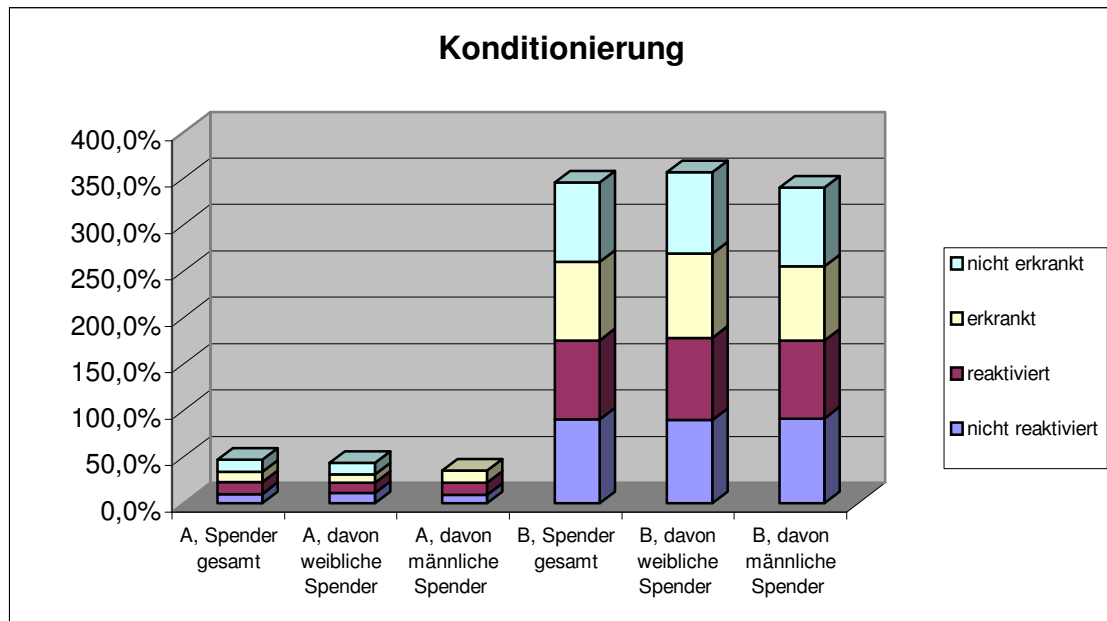


Abbildung 25 Prozentualer Anteil der Verteilung der verschiedenen Konditionierungstherapien für alle Patienten

Vergleich der Konditionierungstherapien (Prozentwerte und Aufteilung in die verschiedenen Gruppen im Anhang Tabelle 11)

A: reduzierte Chemotherapie/2Gy Ganzkörperbestrahlung verglichen mit

B: Hochdosischemotherapie/12Gy Ganzkörperbestrahlung

Patienten	Patienten gesamt	Patienten mit weiblichen Spendern	Patienten mit männlichen Spendern
CMV reaktiviert verglichen mit CMV nicht reaktiviert	p(chi²)=0,779	p(fisher)=1,000	p(fisher)=0,721
CMV reaktiviert und erkrankt verglichen mit CMV reaktiviert und nicht erkrankt	p(fisher)=1,000	p(fisher)=1,000	p(fisher)=1,000
CMV nicht reaktiviert verglichen mit CMV reaktiviert und erkrankt	p(fisher)=1,000	p(fisher)=1,000	p(fisher)=0,625

3.2.4 GvHD-Prophylaxe

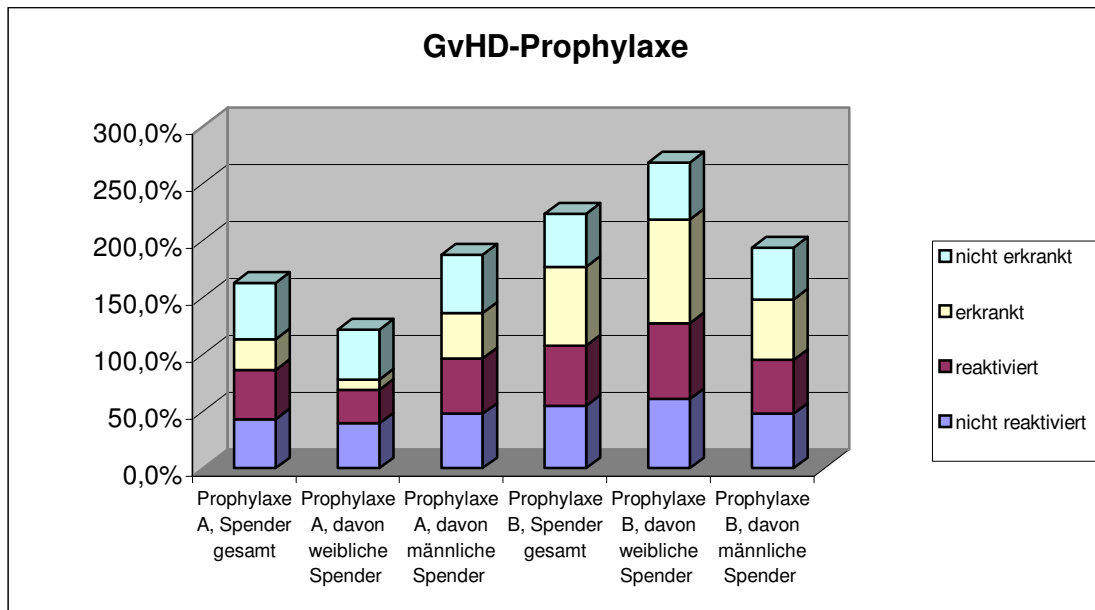


Abbildung 26 Prozentualer Anteil der Verteilung der verschiedenen GvHD-Prophylaxen für alle Patienten

Vergleich der GvHD-Prophylaxe (Prozentwerte und Aufteilung in die verschiedenen Gruppen im Anhang Tabelle 11)

Prophylaxe A: in-vivo T-Zell-Depletion verglichen mit

Prophylaxe B: GvHD-Prophylaxe ohne in-vivo T-Zell-Depletion

Patienten	Patienten gesamt	Patienten mit weiblichen Spendern	Patienten mit männlichen Spendern
CMV reaktiviert verglichen mit CMV nicht reaktiviert	p(chi ²)=0,955	p(fisher)=0,577	p(chi ²)=0,854
CMV reaktiviert und erkrankt verglichen mit CMV reaktiviert und nicht erkrankt	p(fisher)=0,076	p(fisher)=0,084	p(fisher)=0,588
CMV nicht reaktiviert verglichen mit CMV reaktiviert und erkrankt	p(fisher)=0,215	p(fisher)=0,122	p(fisher)=0,742

3.2.5 Akute Graft-versus-Host-Disease

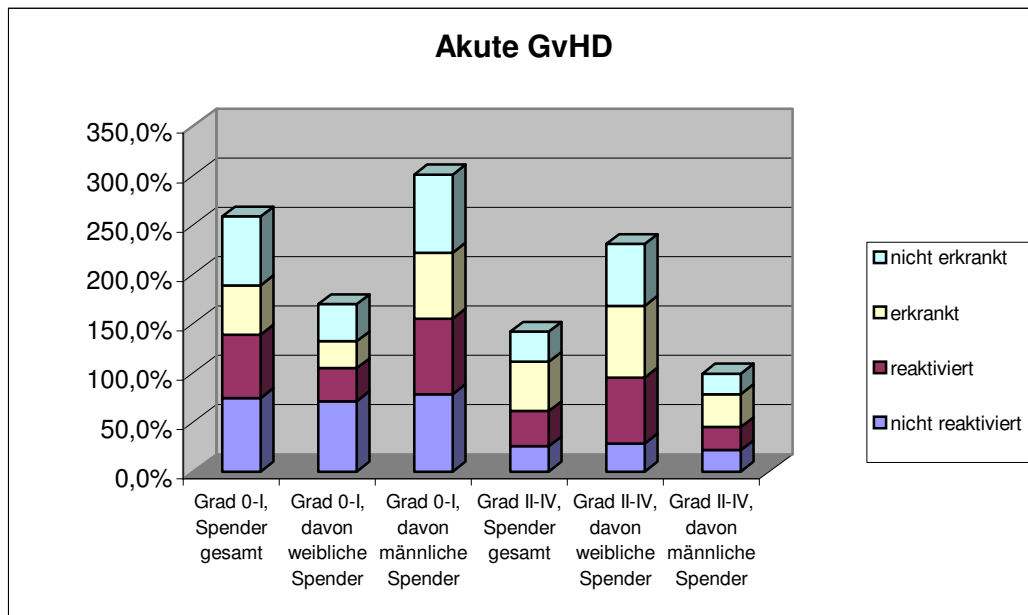


Abbildung 27 Prozentualer Anteil der Verteilung der akuten GvHD-Grade für alle Patienten

Vergleich der Akuten GvHD (Prozentwerte im Anhang Tabelle 11)

Grad 0 bis I verglichen mit Grad II bis IV

Patienten	Patienten gesamt	Patienten mit weiblichen Spendern	Patienten mit männlichen Spendern
CMV reaktiviert verglichen mit CMV nicht reaktiviert	p(chi ²)=0,278	p(chi ²)=0,011	p(chi ²)=0,912
CMV reaktiviert und erkrankt verglichen mit CMV reaktiviert und nicht erkrankt	p(fisher)=0,095	p(fisher)=0,692	p(fisher)=0,320
CMV nicht reaktiviert verglichen mit CMV reaktiviert und erkrankt	p(fisher)=0,042	p(fisher)=0,027	p(fisher)=0,473

3.2.6 Chronische Graft-versus-Host-Disease

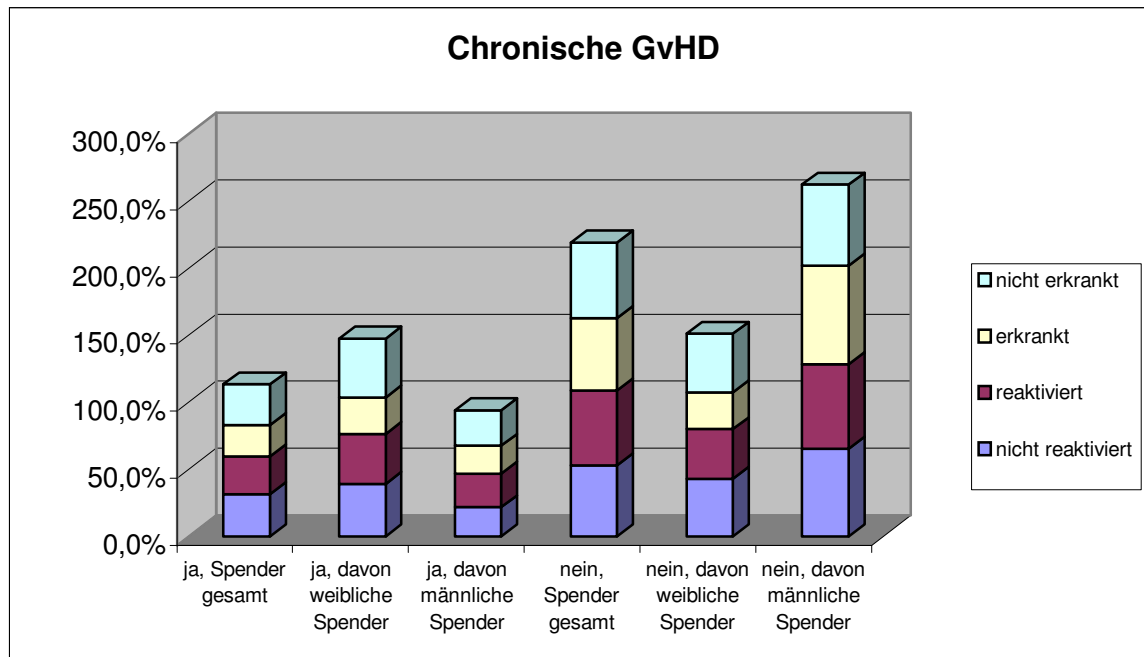


Abbildung 28 Prozentualer Anteil der Verteilung des Vorkommens einer Chronischen GvHD für alle Patienten

Chronische GvHD (Prozentwerte im Anhang Tabelle 11)

Vergleich aufgetreten oder nicht aufgetreten

Patienten	Patienten gesamt	Patienten mit weiblichen Spendern	Patienten mit männlichen Spendern
CMV reaktiviert verglichen mit CMV nicht reaktiviert	p(chi ²)=0,853	p(chi ²)=0,870	p(fisher)=1.000
CMV reaktiviert und erkrankt verglichen mit CMV reaktiviert und nicht erkrankt	p(fisher)=0,789	p(fisher)=1.000	p(fisher)=0,737
CMV nicht reaktiviert verglichen mit CMV reaktiviert und erkrankt	p(fisher)=0,777	p(fisher)=1.000	p(fisher)=1.000

3.2.7 Kortikosteroiddosen

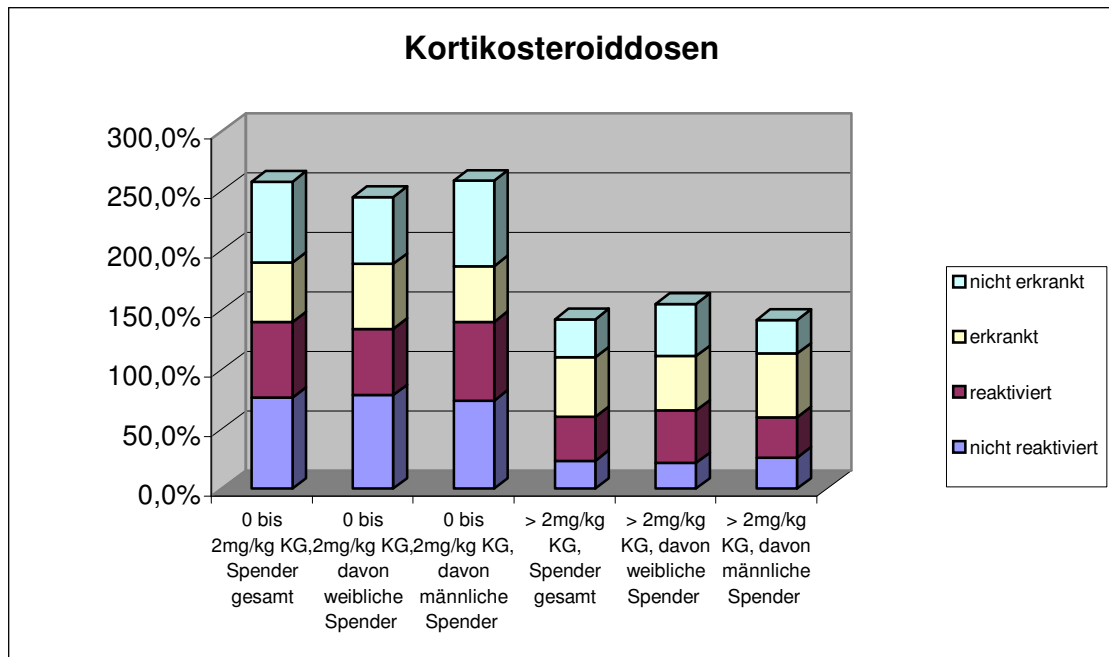


Abbildung 29 Prozentualer Anteil der Verteilung der Verteilung der Kortikosteroiddosen für alle Patienten
 KG = Körpergewicht

Vergleich der Kortikosteroiddosierung (Prozentwerte im Anhang Tabelle 11)

Keine bis ≤ 2 mg pro Kilogramm Körpergewicht verglichen mit
 Dosierung > 2 mg pro Kilogramm Körpergewicht

Patienten	Patienten gesamt	Patienten mit weiblichen Spendern	Patienten mit männlichen Spendern
CMV reaktiviert verglichen mit CMV nicht reaktiviert	p(chi ²)=0,145	p(fisher)=0,089	p(fisher)=0,608
CMV reaktiviert und erkrankt verglichen mit CMV reaktiviert und nicht erkrankt	p(fisher)=0,152	p(fisher)=1.000	p(fisher)=0,120
CMV nicht reaktiviert verglichen mit CMV reaktiviert und erkrankt	p(fisher)=0,023	p(fisher)=0,234	p(fisher)=0,168

3.2.8 Immunologische Rekonstitution

Patienten gesamt

	CMV nicht reaktiviert	CMV reaktiviert	CMV reaktiviert und erkrankt	CMV reaktiviert und nicht erkrankt
Neutropenie nach Tag 100	Ja: 11,5% Nein: 88,5%	Ja: 28,3% Nein: 71,7%	Ja: 20,0% Nein: 80,0%	Ja: 29,3% Nein: 70,7%
Lymphopenie nach 3 Monaten (< 200/ μ l)	Ja: 11,5% Nein: 88,5%	Ja: 13,0% Nein: 87,0%	Ja: 40,0% Nein: 60,0%	Ja: 9,8% Nein: 90,2%

Patienten mit männlichen Spendern

	CMV nicht reaktiviert	CMV reaktiviert	CMV reaktiviert und erkrankt	CMV reaktiviert und nicht erkrankt
Neutropenie nach Tag 100	Ja: 15,4% Nein: 84,6%	Ja: 25,0% Nein: 75,0%	Ja: 33,3% Nein: 66,7%	Ja: 24,2% Nein: 75,8%
Lymphopenie nach 3 Monaten (< 200/ μ l)	Ja: 15,4% Nein: 84,6%	Ja: 11,1% Nein: 88,9%	Ja: 33,3% Nein: 66,7%	Ja: 9,1% Nein: 90,9%

Patienten mit weiblichen Spendern

	CMV nicht reaktiviert	CMV reaktiviert	CMV reaktiviert und erkrankt	CMV reaktiviert und nicht erkrankt
Neutropenie nach Tag 100	Ja: 7,8% Nein: 92,2%	Ja: 40,0% Nein: 60,0%	Ja: 0,0% Nein: 100,0%	Ja: 50,0% Nein: 50,0%
Lymphopenie nach 3 Monaten (< 200/ μ l)	Ja: 7,8% Nein: 92,2%	Ja: 20,0% Nein: 80,0%	Ja: 50,0% Nein: 50,0%	Ja: 12,5% Nein: 87,5%

3.2.9 Überleben

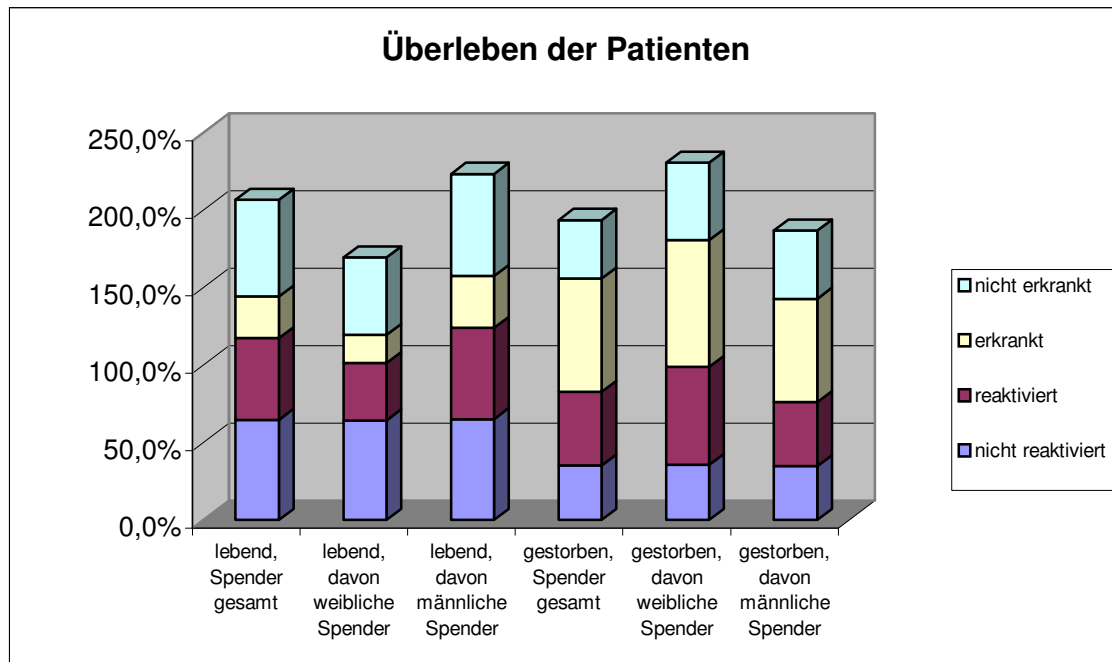


Abbildung 30 Prozentualer Anteil des Überlebens für alle Patienten

Überleben (Prozentwerte im Anhang Tabelle 11)

Anzahl der lebenden Patienten verglichen mit der Zahl der Patienten, die nach Transplantation gestorben sind.

Patienten	Patienten gesamt	Patienten mit weiblichen Spendern	Patienten mit männlichen Spendern
CMV reaktiviert verglichen mit CMV nicht reaktiviert	p(chi ²)=0,219	p(fisher)=0,060	p(fisher)=0,631
CMV reaktiviert und erkrankt verglichen mit CMV reaktiviert und nicht erkrankt	p(chi ²)=0,004	p(fisher)=0,124	p(fisher)=0,036
CMV nicht reaktiviert verglichen mit CMV reaktiviert und erkrankt	p(chi ²)=0,004	p(fisher)=0,014	p(fisher)=0,096

3.3 Vergleich der klinischen Risikofaktoren innerhalb der Gruppen

Im folgenden ist der Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen zwischen weiblichen und männlichen Spendern aufgeführt.

A: Patienten ohne CMV-Reaktivierung

Tabelle 4 Auswertung der klinischen Parameter zwischen weiblichen und männlichen Spendern, ohne CMV-Reaktivierung

GvHD = Graft-versus-Host-Disease KG = Körpergewicht
E = Empfänger S = Spender

Vergleich zwischen weiblichen und männlichen Spendern	Chi ² /Fisher's exakter Test
CMV-Serologie E/S (pos./neg) verglichen mit E/S (pos./pos. oder neg./pos.)	p(fisher)=0,190
Transplantationsmodalität Familiär identisch verglichen mit fremd und familiär mismatch	p(fisher)=0,408
Konditionierung A: reduzierte Chemotherapie/2Gy Ganzkörperbestrahlung verglichen mit B: Hochdosischemotherapie/12Gy Ganzkörperbestrahlung	p(fisher)=1.000
GvHD-Prophylaxe Prophylaxe A: in-vivo T-Zell-Depletion verglichen mit Prophylaxe B: Prophylaxe ohne in-vivo T-Zell-Depletion	p(fisher)=0,568
Akute GvHD Grad 0 bis I verglichen mit Grad II bis IV	p(fisher)=0,749
Chronische GvHD Vergleich aufgetreten mit nicht aufgetreten	p(fisher)=0,206
Kortikosteroiddosen Keine bis ≤ 2mg/kg KG verglichen mit > 2mg/kg KG	p(fisher)=0,749
Überleben Anzahl lebender Patienten verglichen mit der Zahl der Patienten, die nach Transplantation gestorben sind.	p(chi ²)=0,822

B: Patienten mit CMV-Reaktivierung

Tabelle 5 Auswertung der klinischen Parameter zwischen weiblichen und männlichen Spendern, mit CMV-Reaktivierung

GvHD = Graft-versus-Host-Disease KG = Körpergewicht
 E = Empfänger S = Spender

Vergleich zwischen weiblichen und männlichen Spendern	Chi ² /Fisher's exakter Test
CMV-Serologie	p(fisher)=0,059
E/S (pos./neg) verglichen mit E/S (pos./pos. oder neg./pos.)	
Transplantationsmodalität	p(chi ²)=0,895
Familiär identisch verglichen mit fremd und familiär mismatch	
Konditionierung	p(fisher)=1,000
A: reduzierte Chemotherapie/2Gy Ganzkörperbestrahlung verglichen mit	
B: Hochdosischemotherapie/12Gy Ganzkörperbestrahlung	
GvHD-Prophylaxe	p(fisher)=0,105
Prophylaxe A: in-vivo T-Zell-Depletion verglichen mit	
Prophylaxe B: Prophylaxe ohne in-vivo T-Zell-Depletion	
Akute GvHD	p(fisher)=0,001
Grad 0 bis I verglichen mit Grad II bis IV	
Chronische GvHD	p(fisher)=0,102
Vergleich aufgetreten mit nicht aufgetreten	
Kortikosteroiddosen	p(fisher)=0,354
Keine bis ≤ 2mg/kg KG verglichen mit > 2mg/kg KG	
Überleben	p(fisher)=0,070
Anzahl lebender Patienten verglichen mit der Zahl der Patienten, die nach Transplantation gestorben sind.	

C: Patienten mit CMV-Reaktivierung und Erkrankung

Tabelle 6 Auswertung der klinischen Parameter zwischen weiblichen und männlichen Spendern, mit CMV-Reaktivierung und Erkrankung

GvHD = Graft-versus-Host-Disease KG = Körpergewicht
E = Empfänger S = Spender

Vergleich zwischen weiblichen und männlichen Spendern	Chi ² /Fisher's exakter Test
CMV-Serologie E/S (pos./neg) verglichen mit E/S (pos./pos. oder neg./pos.)	p(fisher)=1,000
Transplantationsmodalität Familiär identisch verglichen mit fremd und familiär mismatch	p(chi ²)=0,103
Konditionierung A: reduzierte Chemotherapie/2Gy Ganzkörperbestrahlung verglichen mit B: Hochdosischemotherapie/12Gy Ganzkörperbestrahlung	p(fisher)=1,000
GvHD-Prophylaxe Prophylaxe A: in-vivo T-Zell-Depletion verglichen mit Prophylaxe B: Prophylaxe ohne in-vivo T-Zell-Depletion	p(fisher)=0,090
Akute GvHD Grad 0 bis I verglichen mit Grad II bis IV	p(fisher)=0,112
Chronische GvHD Vergleich aufgetreten mit nicht aufgetreten	p(fisher)=0,303
Kortikosteroiddosen Keine bis ≤ 2mg/kg KG verglichen mit > 2mg/kg KG	p(fisher)=1,000
Überleben Anzahl lebender Patienten verglichen mit der Zahl der Patienten, die nach Transplantation gestorben sind.	p(fisher)=0,658

D: Patienten mit CMV-Reaktivierung ohne CMV-Erkrankung

Tabelle 7 Auswertung der klinischen Parameter zwischen weiblichen und männlichen Spendern, mit CMV-Reaktivierung ohne CMV-Erkrankung

GvHD = Graft-versus-Host-Disease KG = Körpergewicht
 E = Empfänger S = Spender

Vergleich zwischen weiblichen und männlichen Spendern	Chi ² /Fisher's exakter Test
CMV-Serologie	p(fisher)=0,041
E/S (pos./neg) verglichen mit E/S (pos./pos. oder neg./pos.)	
Transplantationsmodalität	p(fisher)=0,566
Familiär identisch verglichen mit fremd und familiär mismatch	
Konditionierung	p(fisher)=1,000
A: reduzierte Chemotherapie/2Gy Ganzkörperbestrahlung verglichen mit	
B: Hochdosischemotherapie/12Gy Ganzkörperbestrahlung	
GvHD-Prophylaxe	p(fisher)=0,772
Prophylaxe A: in-vivo T-Zell-Depletion verglichen mit	
Prophylaxe B: Prophylaxe ohne in-vivo T-Zell-Depletion	
Akute GvHD	p(fisher)=0,004
Grad 0 bis I verglichen mit Grad II bis IV	
Chronische GvHD	p(fisher)=0,211
Vergleich aufgetreten mit nicht aufgetreten	
Kortikosteroiddosen	p(fisher)=0,359
Keine bis ≤ 2mg/kg KG verglichen mit > 2mg/kg KG	
Überleben	p(fisher)=0,258
Anzahl lebender Patienten verglichen mit der Zahl der Patienten, die nach Transplantation gestorben sind.	

4 Diskussion

Infektionen, besonders die Reaktivierung des Cytomegalievirus und die mit ihm verbundenen Komplikationen, stellen für Patienten nach Knochenmarktransplantation bzw. nach Übertragung peripherer Stammzellen, nach wie vor ein großes Problem dar [37]. Trotz des Bestrebens einen Spender mit möglichst gleichem CMV-Serostatus wie demjenigen des Empfängers auszuwählen, weiteren Fortschritten in Diagnostik und Therapie, liegt das Risiko der CMV-Reaktivierung nach wie vor zwischen 30% und 50% [5, 58]. Die Gefahr für eine klinisch manifeste CMV Erkrankung, die einer Reaktivierung folgen kann, liegt bei 8% bis 16% [50, 98], wobei eine interstitielle Pneumonie, bedingt durch Cytomegalieviren unbehandelt zum Tod führt [49].

Es ist bekannt, dass zytotoxische T-Zellen, CD4-T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen und neutralisierende Antikörper für die CMV-Abwehr eine Rolle spielen [60, 66, 75]. Der Einfluss einzelner Mechanismen, die Bedeutung von Strukturen der Immunabwehr und der Einfluss einzelner Zytokine bzw. eine veränderte Struktur oder Genexpression, der an der Virusabwehr beteiligten Komponenten, ist noch nicht hinreichend erforscht.

Im Rahmen eines vorangehenden Projekts der Arbeitsgruppe zeigte sich, dass mit CMV exponierte dendritische Zellen verstärkt Toll-like-Rezeptor 3 exprimieren.

In dieser Studie soll nun der mögliche Einfluss von Einzelbasensubstitutionen (SNPs) in Toll-like-Rezeptoren und ein möglicher Zusammenhang mit Risikofaktoren für CMV-Reaktivierung bzw. Erkrankung nach Blutstammzelltransplantation diskutiert werden.

4.1 Schmelzkurven- und Assoziationsanalyse

Die Schmelzkurvenanalyse mittels LightCycler Technologie ist eine einfache, genaue und reproduzierbare Methode, um in kurzer Zeit die vorliegende DNA auf Einzelbasensubstitutionen zu untersuchen.

Die Differenzierung der Genotypen ist unabhängig von der Ausgangsmenge an DNA und kann direkt im Anschluss an die Amplifikation erfolgen, ohne, dass die Reaktionsgefäße geöffnet werden müssen. Damit wird einer Kontamination und folglich einer Ergebnisverfälschung vorgebeugt. Auch entfallen im Gegensatz zur gewöhnlichen Sequenzierungs-PCR die arbeitsintensiven Schritte wie Amplifikation, Aufreinigung des Amplifikats und die eigentliche Sequenzierung. Die Schmelzkurvenanalyse mit der LightCycler Technologie hat sich zur Diagnostik von Punktmutationen im Faktor V Leiden Gen und im Prothrombingen bewährt [45, 95].

Die Versuche mit Real-time PCR, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, waren alle reproduzierbar und dauerten, bei einem maximal möglichen Einsatz von 31 Proben und einer Negativkontrolle pro Versuchsdurchgang, weniger als eineinhalb Stunden.

Die Auswertung der Daten erfolgte nach dem Vorbild einer klassischen Assoziationsanalyse, um die Genotyp- bzw. Allelverteilung in den einzelnen Gruppen zu vergleichen. Sehr gut eignen sich hierfür der Armitage's-Trend-Test und der Allele-Frequenz-Differenz-Test. Da die Gene für TLR 8 auf dem x-Chromosom liegen, können männliche Individuen nicht heterozygot sein. Aus diesem Grund wurden die Assoziationsanalysen getrennt nach Spendergeschlecht durchgeführt. Eine Assoziation zwischen Gen und Krankheit bzw. Reaktivierung besteht dann, wenn die Häufigkeit eines Allels zwischen der Gruppe der Erkrankten bzw. Reaktivierten und der Gesunden bzw. nicht reaktivierten signifikant verschieden ist [27]. Ein Unterschied in den Allelfrequenzen ist jedoch nicht immer mit einer Kausalität der Krankheit gleichzusetzen. Andere Faktoren wie Populationsstratifizierung, hierzu gehört eine unterschiedliche ethnische Herkunft der Personen in der Fall- bzw. Kontrollgruppe, können zu falsch positiven Assoziationsbefunden führen (confounding) [15]. Bei der Auswahl der Patienten in dieser Studie wurde auf eine gemeinsame bzw. ähnliche ethnische Herkunft geachtet. Im folgenden sind die Ergebnisse für die einzelnen untersuchten SNPs zusammengefasst.

Für die SNPs rs 352140 in TLR 9 unabhängig des Spendergeschlechts und den Polymorphismen rs 2407992, rs 3764880 und rs 3747414 in TLR 8 für Patienten mit männlichen Spendern (Abb.10, 13, 18):

- Mehr Patienten die CMV reaktivieren als nicht reaktivieren tragen die SNPs
- Die Häufigkeit der Mutationen ist in der Gruppe der nicht erkrankten größer als in der Gruppe der am Cytomegalievirus erkrankten Individuen
- insgesamt sind Patienten mit männlichen Spendern, die reaktiviert haben und nicht erkrankt sind die häufigsten Träger dieser Polymorphismen

Zwei p-Werte sind signifikant:

$p = 0,039$ (TLR 8, rs 3747414 für den Vergleich CMV erkrankt versus reaktiviert und nicht erkrankt, männliche Spender)

$p = 0,050$ (TLR 8, rs 3764880 für den Vergleich CMV reaktiviert versus nicht reaktiviert, männliche Spender)

Diese Ergebnisse entsprechen nicht denjenigen für Patienten mit weiblichen Spendern für TLR 8 (Abb. 9, 12, 17):

Für rs 2407992 und rs 3747414 in TLR 8 gilt:

- es tragen mehr Patienten die nicht reaktiviert haben, als die reaktiviert haben die SNPs
- die Häufigkeit der Polymorphismen ist in der Gruppe der Personen, die erkrankt sind höher verglichen mit den Individuen, die nicht erkrankt sind
- Patienten mit weiblichen Spendern, die nicht reaktiviert haben tragen diese Mutationen am häufigsten

Für rs 3764880 gilt:

- Am häufigsten tragen Personen, die reaktiviert haben und erkrankt sind den SNP
- mehr erkrankte als nicht erkrankte und gleich viele Patienten mit weiblichen Spendern, die reaktiviert haben, als die, die nicht reaktiviert haben, sind Träger der Mutation

Die Ergebnisse der Assoziationsanalyse für Patienten mit männlichen Spendern geben einen Hinweis darauf, dass das häufigere Vorkommen dieser SNPs mit einer CMV-Reaktivierung assoziiert ist, wohingegen eine CMV Erkrankung nicht mit einem häufigeren Vorkommen der Polymorphismen korreliert zu sein scheint.

Für Patienten mit weiblichen Spendern scheint das häufigere Auftreten dieser SNPs mit einer CMV Erkrankung assoziiert zu sein, nicht dagegen mit einer Reaktivierung des Cytomegalievirus. Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen weiblichen und männlichen Spendern, könnten an einer deutlich geringeren Fallzahl von Patienten mit weiblichen Spendern (37,7% zu 62,3%) liegen. Die Anzahl der Patienten mit weiblichen Spendern und CMV-Erkrankung umfasst nur 11 Patienten, deren Allele sich auf die drei Gruppen Wildtyp, heterologe und homologe Mutation verteilen.

Für die untersuchten SNPs rs 574077 im TLR 8 Gen, rs 5743842 in TLR 9 und den beiden Polymorphismen rs 3775291 und rs 5743318 in TLR 3 (Abb. 19 bis 22) ergaben sich keine Unterschiede in den einzelnen Gruppen, bzw. es konnte nur der Wildtyp detektiert werden, darum erfolgte keine Assoziationsanalyse. Es wurden nur 50 bis 80 Proben statt 146 untersucht.

Da die Gene für den Toll-like-Rezeptor 8 auf dem x-Chromosom liegen und folglich männliche Individuen nicht heterozygot sein können, ist die Tatsache, dass der Patient mit der Nummer 47 (Anhang, Tabelle 8) heterozygot für rs 3764880 (Abb.19) ist, am wahrscheinlichsten auf einen vorliegenden Chimärismus zurückzuführen. Die untersuchte DNA-Probe wurde bereits eine Woche nach der Transplantation aus dem Blut gewonnen, hierbei handelt es sich um einen Einzelfall, was ein Vorliegen eines lymphohämatopoetischen Chimärismus sehr wahrscheinlich macht. Denn falls die Stammzellen des Spenders erfolgreich angenommen werden, besteht oft noch kurz nach Transplantation eine Mischung aus Empfänger- und Spenderzellen im Blut. Dieser Chimärismus ist nicht stabil und geht im Laufe der Zeit in eine Dominanz der Spenderzellen über, dann liegt ein so genannter Spenderchimärismus vor [73].

Bei der Schmelzkurvenanalyse ergaben sich bei der Detektion des SNP rs 3747414 Kurven mit drei verschiedenen Maxima (Abb. 14 und 15). Das bedeutet, dass in dieser Gensequenz der entsprechenden Proben ein zusätzlicher Basenaustausch stattgefunden hat, der mit der gleichen Sonde detektiert wurde. Voraussetzung dafür ist es, dass die hier verwendete Sensor-Sonde, bestehend aus 26 Basenpaaren, die Position des zusätzlichen Basenaustausches überspannt. Nach Nachforschung in der NCBI-Datenbank [63] ist es am wahrscheinlichsten, dass es sich hierbei um den SNP mit der Bezeichnung rs 5744083 handelt. Dieser Polymorphismus ist 6 Basenpaare von rs 3747414 entfernt und kann somit von der eingesetzten Detektionssonde überbrückt werden. Die Tatsache, dass es bei der Schmelzkurvenanalyse für diese Einzelbasenmutation nur drei Kurven mit einem anderen Maximum ergeben hat, lässt sich durch eine geringe geschätzte Heterozygotenhäufigkeit dieses Polymorphismus von 0,021 erklären.

Das Vorgehen der bisherigen Auswertung suggeriert eine monokausale Betrachtungsweise der Beziehung zwischen Genotyp und Erkrankung. Es scheint unwahrscheinlich, dass einzelne Mutationen in Rezeptoren, die eine noch nicht vollständig geklärte Funktion in der Immunabwehr von Viren insbesondere des Cytomegalievirus besitzen, alleine ursächlich für das Risiko einer Reaktivierung bzw. Erkrankung sein sollen. Weitere genetische Einflussgrößen bzw. bekannte Risikofaktoren für eine CMV-Reaktivierung haben bzw. können ebenfalls ursächliche Funktion haben.

Aus diesem Grund wurden retrospektiv aus archivierten Krankenakten mögliche klinische Risikofaktoren erhoben und ausgewertet. Da es bezüglich der Ergebnisse der Assoziationsanalysen zwischen Patienten mit weiblichen und männlichen Spendern große Unterschiede gibt, wurden die klinischen Daten der Patienten ebenfalls zusätzlich nach dem Spendergeschlecht ausgewertet. Es wurden jeweils die Ergebnisse zwischen den Gruppen nicht reaktiviert versus reaktiviert, nicht reaktiviert versus erkrankt und nicht erkrankt versus nicht erkrankt verglichen. Ergänzend erfolgte ein Vergleich der Patienten abhängig ihres Spendergeschlechts innerhalb der einzelnen vier Gruppen.

4.2 Analyse der Risikofaktoren

Der Einfluss des CMV-Serostatus, der Transplantationsmodalität, der Konditionierungstherapie, der GvHD-Prophylaxe und der Graft-versus-Host-Disease auf das Risiko das Cytomegalievirus zu reaktivieren bzw. an ihm zu erkranken, ist bekannt und wird diskutiert.

Die Gefährdung für einen CMV positiven Empfänger das Virus zu reaktivieren ist im Gegensatz zu einem negativen Status seitens des Empfängers unbestritten [12, 58]. Dagegen wird die Bedeutung des CMV-Status des Spenders kontrovers diskutiert. In früheren Studien war eine positive CMV-Serologie des Spenders mit einem größeren Risiko für eine CMV-Infektion verbunden [58]. Eine andere Untersuchung führte zu dem Ergebnis, dass die Transplantation von Knochenmark eines CMV negativen Spenders auf einen CMV positiven Empfänger mit einem fünfzehnmal höheren Risiko verbunden ist an einer Viruspneumonie zu erkranken und daran zu sterben, als bei Übertragung eines CMV positiven Transplantats [33]. Eine neuere Studie veröffentlichte, dass Patienten, die ein Transplantat eines seropositiven, nicht verwandten Spenders erhielten, eine höhere Überlebensrate haben [51].

In dieser Untersuchung konnte bezüglich des CMV-Serostatus zwischen Empfänger und Spender (Abb. 23, Tabelle 7), nur im Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Es ergab sich ein schwach signifikanter p-Wert von 0,041 zwischen den verschiedenen Geschlechtern in der Gruppe der reaktivierten und nicht erkrankten. Mehr Patienten mit weiblichen Spendern (Tabelle 11), 43,8% zu 17,0% wiesen einen Spender mit negativem CMV-Serostatus auf.

Allgemein scheinen Patienten, die ein Transplantat eines fremden oder eines verwandten Spenders mit mismatch erhalten, ein größeres Risiko für eine CMV Erkrankung zu besitzen [50]. Dies konnte sich hier für den Vergleich der Patienten mit männlichem Spender zwischen der Gruppe der erkrankten (80%) und den Personen die reaktiviert haben und nicht erkrankt sind (43,5%) bestätigen (Abb. 24, Tabelle 11). Es ergab sich hierbei ein p von 0,037 für Patienten mit männlichen Spendern.

Der Einfluss der verschiedenen Konditionierungstherapien, insbesondere ob eine Hochdosis Ganzkörperbestrahlung durchgeführt wurde scheint nicht mehr so bedeutend zu sein wie früher angenommen wurde [50]. In dieser Untersuchung wurden ebenfalls keine signifikanten Differenzen festgestellt (Abb. 30 bis 32). Erhalten die Patienten CD34 selektionierte Stammzellen eines unverwandten Spenders, ist mit einer höheren Infektionsrate zu rechnen [9]. Sowohl im Gruppenvergleich, als auch innerhalb der Gruppe ergaben sich keine bedeutenden Unterschiede (Abb. 33).

Das Auftreten einer Graft-versus-Host-Disease, insbesondere die akute Form, ist mit einem erhöhten Risiko für eine CMV-Infektion verbunden [58]. Die Gruppe der an CMV erkrankten Personen mit weiblichen Spendern erlitten deutlich häufiger eine akute GvHD Grad II bis IV, als die nicht reaktivierten (72,7% versus 28,6%, $p=0,027$, Tabelle 11). Betrachtet man alle Patienten (Abb. 27), haben an CMV erkrankte Personen mit 50% doppelt so häufig eine schwere akute GvHD, als Patienten die nicht reaktiviert haben (25,5%), $p=0,042$. Ein signifikanter p -Wert von 0,011 ergab sich für den Vergleich reaktiviert und nicht reaktiviert: 66,7% der an CMV reaktivierten mit weiblichen Spendern bekamen im Vergleich zu 28,6% der nicht reaktivierten eine schwere GvHD. Innerhalb der Gruppen CMV reaktiviert ($p=0,001$) und CMV reaktiviert und nicht erkrankt ($p=0,004$) ergaben sich zwischen den Patienten deutliche Unterschiede (Tabelle 5, 7, 11). Personen mit Spenderinnen bekamen viel öfter (66,7% zu 23,5% und 62,5% zu 20,8%) eine schwere Form der akuten GvHD. Eine chronische GvHD (Abb. 28) kam in keiner Gruppe gehäuft vor.

Ein weiterer Vergleich wurde für den Einsatz verschieden großer Kortikosteroiddosen aufgestellt (Abb. 29). Patienten, die keine oder bis 2mg/kg KG erhielten wurden mit Patienten, die eine Dosis über 2mg/kg Körpergewicht bekamen, verglichen.

Nur der Vergleich CMV nicht reaktiviert versus an CMV erkrankt, unabhängig des Spendergeschlechts, ergab ein signifikantes p von 0,023. Doppelt so viele erkrankte (50% zu 23,5%) bekamen die höhere Dosis.

Es ist beschrieben, dass eine verzögerte oder fehlende Rekonstitution des zellulären Immunsystems zu einem höheren Risiko der Reaktivierung führt [20].

Da viele Labordaten bezüglich Neutropenie nach Tag 100 und Lymphopenie nach drei Monaten nach Transplantation nicht zu erheben waren und somit die Fallzahlen sehr klein sind, wurden keine statistischen Verfahren zur Auswertung herangezogen. Gleichwohl zeigt sich die Tendenz, dass Patienten, die reaktiviert haben bzw. die zusätzlich am Cytomegalievirus erkrankt sind häufiger eine Neutropenie und Lymphopenie aufweisen.

Betrachtet man das Outcome (Abb. 30), überlebten in der Gruppe der an CMV erkrankten unabhängig des Spendergeschlechts am wenigsten Patienten. Nur im Vergleich der einzelnen Gruppen miteinander, nicht im Vergleich innerhalb der Gruppen ergaben sich signifikante Unterschiede.

Zusammengefasst ergaben sich im Vergleich der vier Gruppen untereinander folgende signifikante p-Werte:

Patienten gesamt:

- $p=0,042$, mehr Patienten (50,0% zu 25,5%), die erkrankt sind bekamen eine schwere akute GvHD, als die nicht reaktivierten
- $p=0,023$, mehr Patienten (50,0% zu 23,5%), die erkrankt sind erhielten eine Kortikosteroiddosis von mehr als 2mg/KG Körpergewicht, als Patienten, die nicht reaktiviert haben

Patienten mit weiblichem Spender:

- $p=0,027$, mehr Patienten (72,7% zu 28,6%), die erkrankt sind erlitten eine akute GvHD Grad II bis IV, als die nicht reaktivierten
- $p=0,011$, mehr Patienten (66,7% zu 28,6%), die reaktivierten bekamen eine akute GvHD Grad II bis IV, als Personen, die nicht reaktiviert haben

Patienten mit männlichem Spender:

- $p=0,037$, mehr Patienten, die erkrankt sind (80% zu 45,3%) im Vergleich zu den nicht erkrankten, erhielten ein Transplantat eines unverwandten Spenders oder eines verwandten Spenders mit mismatch

Zusammengefasst ergaben sich im Vergleich innerhalb der vier Gruppen folgende signifikante p-Werte:

Patienten reaktiviert:

- $p=0,001$, mehr Patienten mit Spenderinnen (66,7% zu 23,5%) erlitten eine schwere akute GvHD

Patienten nicht erkrankt:

- $p=0,041$, mehr Patienten mit weiblichen Spendern (43,8% zu 17,0%) bekamen ein Transplantat eines CMV seronegativen Spenders.
- $p=0,004$, mehr Patienten mit weiblichen Spendern (62,5% zu 20,8%) erlitten eine akute GvHD Grad II bis IV

Die Ergebnisse der Risikofaktorenanalyse unterstützen die Hypothese, dass nicht nur einer dieser klinischen Faktoren bzw. eine Kombination daraus verantwortlich für eine Reaktivierung, bzw. Erkrankung am Cytomegalievirus ist. Denn im Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander zwischen Patienten unabhängig des Spendergeschlechts und zwischen Personen mit männlichen Spendern, ist im Vergleich zwischen reaktiviert und nicht reaktiviert, kein Risikofaktor signifikant erhöht. Dagegen weisen die Ergebnisse der Assoziationsanalyse darauf hin, dass die SNPs in Toll-like-Rezeptoren mit einer CMV-Reaktivierung assoziiert sind, ($p = 0,050$ für TLR 8, rs 3764880 für den Vergleich CMV reaktiviert versus nicht reaktiviert bei Patienten mit männlichen Spendern). Die Tatsache, dass die Häufigkeit der SNPs in der Gruppe der nicht erkrankten größer als in der Gruppe der am Cytomegalievirus erkrankten Individuen ($p = 0,039$ (TLR 8, rs 3747414 für männliche Spender) ist, könnte für einen größeren Einfluss der klinischen Risikofaktoren auf eine CMV Erkrankung nach Reaktivierung, als auf die Reaktivierung selbst, sprechen. Mehr Patienten mit männlichen Spendern die erkrankt sind erhielten ein Transplantat eines unverwandten Spenders ($p=0,037$) und mehr Patienten, die erkrankten bekamen eine schwere akute GVHD ($p=0,042$) oder erhielten höhere Kortikosteroiddosen ($p=0,023$). Beides Vorgänge, die sich nach der Transplantation abspielen, wenn die immunologische Rekonstitution bereits stattgefunden hat. Patienten mit weiblichen Spendern weisen keine signifikanten Werte bezüglich der Unterschiede in der Verteilung der Polymorphismen auf, dennoch ist überraschend, dass sich die Häufigkeiten gegenüber männlichen Spendern umgekehrt verhalten. Es wäre denkbar, dass die Spendergeschlechter einen unterschiedlichen Einfluss nehmen, die Häufigkeit verschiedener Krankheiten ist oft auch nicht gleichmäßig auf Männer und Frauen verteilt.

Am wahrscheinlichsten dafür ist aber eine deutlich kleinere Fallzahl von weiblichen Spendern verantwortlich. Zwar erlitten mehr Patienten mit Spenderinnen als mit männlichen Spendern eine schwere GVHD ($p=0,001$), bzw. hatten schwach signifikant ($p=0,041$) häufiger einen Spender mit CMV seronegativem Status, dies erklärt aber nicht unbedingt die beobachteten geschlechtsabhängigen Unterschiede.

Folglich lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass es einen Hinweis gibt, dass die Reaktivierung des CMV mit diesen Einzelbasensubstitutionen in Toll-like-Rezeptoren assoziiert sein könnte, nicht dagegen die Erkrankung, für die die klinischen Risikofaktoren eine größere Rolle zu spielen scheinen.

Es ist bekannt, dass Einzelbasensubstitutionen mit Erbkrankheiten wie z.B. mit der β -Thalämie, der Sichelzellanämie oder mit der hereditären Hämatochromatose assoziiert sind [44]. Sie stehen in Zusammenhang mit Resistenzen gegenüber antibakterieller und antiviraler Therapie [93]. SNPs nehmen Einfluss auf den Verlauf von Infektionskrankheiten wie einer Hepatitis C [71], oder führen im Apolipoprotein A5-Gen zu erhöhten Plasmalipidspiegeln [22]. Polymorphismen in TLR10 und TLR6 erhöhen das Risiko an Asthma zu erkranken [46, 83] und SNPs in TLR4 scheinen einer Studie zufolge mit einem erhöhten Risiko Prostatakrebs zu erleiden, verbunden zu sein [103].

Das Verständnis der Zusammenhänge von Toll-like-Rezeptoren und der Abwehr von Mikroorganismen und Viren, speziell von Cytomegalieviren ist noch nicht hinreichend erforscht. Erst dieses Jahr wurde ein neuer Untertyp (TLR11) [102] identifiziert. Es scheint vielversprechend, dass in naher Zukunft noch weitere Liganden der TLR definiert werden. TLR 3 und 9 spielen wohl bei der Abwehr des murinen Cytomegalievirus eine Rolle, zu diesem Ergebnis führten Untersuchungen mit Mäusen [81]. TLR9, der als Ligand CpG Motive erkennt scheint bei der Immunantwort auf Herpes simplex Virus 2, dessen Genom reich an diesen Motiven ist, mitzuwirken [54]. Bisher gibt es keine veröffentlichten Ergebnisse zu Untersuchungen der in dieser Studie ausgewerteten SNPs. Weiterhin ist die Frage nach der konkreten Auswirkung des Austauschs der einzelnen Basen bzw. der Aminosäuren interessant. Speziell für den Polymorphismus rs 3764880 in TLR8.

Dieser trägt eine Missense-Mutation von Methionin zu Valin an Aminosäureposition eins [63]. Inwiefern sie eine Strukturänderung des Toll-like-Rezeptors bewirkt und als Folge eine veränderte Signalkaskade mit fehlender oder veränderter Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B hat, bleibt offen [34].

Die Bedeutung, die SNPs bei der Entstehung und Bewältigung von Krankheiten beigemessen wird ist sehr hoch. Der Schwerpunkt der Genomforschung richtet sich nicht mehr primär auf die Identifizierung neuer Gene, sondern mehr auf das Verständnis des Beitrags einzelner Gene zu bestimmten Phänotypen. Mit der Veröffentlichung der nahezu kompletten Gensequenz des menschlichen Genoms trat das Humane Genomprojekt in eine neue Phase ein [92]. Durch das Human Genome Diversity Projekt wurden genetische Varianten identifiziert mit dem Ziel eine Beziehung zwischen der Variabilität der DNA-Sequenz und der Variabilität eines Phänotyps darzustellen. Die Erwartungen an das Projekt wurden bisher nicht befriedigend eingelöst [91], da meist nicht nur eine bestimmte Einzelbasenmutation für eine Erkrankung bzw. im Falle dieses Projekts, für eine Reaktivierung verantwortlich ist. Neben direkt krankheitsauslösenden SNPs, führen andere zu einem erhöhten Krankheitsrisiko.

Die Bestimmung der verschiedenen Allele wird in Zukunft eine wichtige Rolle spielen. Denn klinische Diagnosen stützen sich zunehmend auf den molekularen Nachweis von krankheitsassoziierten Genvarianten, um in der Lage zu sein Risikofaktoren für den Patienten gezielt zu vermeiden und eine verbesserte Prophylaxe zu betreiben. Der Ansatz dieses Projekts, die Untersuchung von single nucleotide polymorphisms in Toll-like Rezeptoren bei Patienten nach Stammzelltransplantation, im Zusammenhang mit dem Risiko einer CMV-Reaktivierung bzw. Erkrankung ist vielversprechend. Mit dem Ziel, den Ursachen für CMV-Reaktivierung und Erkrankung näher zu kommen, um die Patienten noch besser prophylaktisch betreuen zu können, auch im Hinblick auf eine gezieltere Spenderauswahl, sind weitere Projekte mit mehr Patienten anzustreben. Die SNP-Analyse in anderen TLR, insbesondere TLR7, dessen Lokalisation und Gensequenz mit 42,3% derjenigen des TLR8 sehr ähnlich ist [82], und in weiteren an der Immunabwehr bedeutsamen Komponenten scheint aussichtsreich zu sein.

5. Zusammenfassung

Infektionen, verursacht durch das Cytomegalievirus, stellen für Patienten nach Stammzelltransplantation, trotz Fortschritten in Diagnostik und Therapie, nach wie vor eine schwere Komplikation dar. Klinische Risikofaktoren für eine CMV-Reaktivierung, wie ein positiver CMV-Serostatus des Empfängers oder eine Entwicklung einer schweren akuten Graft-versus-Host-Disease, sind bekannt. Um möglichst schon prophylaktisch, auf eine gute Lebensqualität nach der Transplantation, Einfluss zu nehmen, müsste man weitere ursächliche Faktoren, die ein erhöhtes Infektionsrisiko bedingen, kennen.

Nach Veröffentlichung der nahezu vollständigen Gensequenz des menschlichen Erbguts, ist das Humane Genomprojekt in eine weitere Phase eingetreten. Der Schwerpunkt der Forschung richtet sich nicht mehr primär auf die Identifizierung neuer Gene, sondern darauf, dass die Beziehung zwischen Genvarianten, die größtenteils durch Einzelbasensubstitutionen (SNPs) bedingt sind, und der Variabilität der Phänotypen verstanden wird. Neben direkt krankheitsauslösenden Punktmutationen, z.B. bei der Sichelzellanämie, führen andere Polymorphismen zur Erhöhung eines Krankheitsrisikos.

In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen der Verteilung von definierten SNPs in den Toll-like-Rezeptoren 3, 8 und 9 und dem Risiko einer CMV-Reaktivierung bzw. Erkrankung nach allogener Stammzelltransplantation, untersucht. Im Rahmen eines vorangehenden Projekts der Arbeitsgruppe zeigte sich, dass mit CMV exponierte dendritische Zellen verstärkt Toll-like-Rezeptor 3 exprimierten.

Toll-like-Rezeptoren, eine relativ neu entdeckte Gruppe, erkennen krankheitsassoziierte molekulare Muster (PAMPs=pathogen associated molecular patterns). Sie sind an der Immunabwehr von Mikroorganismen und Viren beteiligt. Als Methode, die DNA auf Einzelbasensubstitutionen zu untersuchen, wurde die Schmelzkurvenanalyse mittels LightCycler Technologie gewählt. Sie zeichnet sich durch ihre einfache, genaue und reproduzierbare Art aus, und hat sich unter anderem zur Diagnostik von Punktmutationen im Faktor V Leiden Gen bewährt.

Mittels Assoziationsanalysen wurden die Daten der 146 Patienten, zwischen den Gruppen: CMV nicht reaktiviert, CMV reaktiviert und erkrankt bzw. nicht erkrankt, verglichen. Da die Gene für TLR 8 auf dem x-Chromosom liegen, können männliche Individuen nicht heterozygot sein. Aus diesem Grund erfolgten Assoziationsanalysen getrennt nach Spendergeschlecht. Schwach signifikante Unterschiede bezüglich der Häufigkeit des SNP rs 3764880 in TLR8 im Vergleich reaktiviert versus nicht reaktiviert bei Patienten mit männlichen Spendern, geben einen Hinweis auf eine Assoziation dieses SNP mit einer Reaktivierung des Cytomegalievirus. Die Tatsache, dass für rs 3747414 in TLR8 signifikant mehr nicht erkrankte als erkrankte Personen mit männlichen Spendern die Einzelbasensubstitution tragen, spricht dafür, dass die Erkrankung nicht mit dem SNP assoziiert ist. Klinische Risikofaktoren, die ebenfalls in dieser Arbeit erhoben und analysiert wurden und in der Gruppe der an CMV erkrankten signifikant häufiger eine schwere akute GvHD aufwiesen, oder andere noch unbekannte Komponenten scheinen hier eine größere Rolle zu spielen. Diese Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse entsprechen nicht denjenigen für Patienten mit weiblichen Spendern, was höchstwahrscheinlich auf eine deutlich geringere Fallzahl zurückzuführen ist.

Der Ansatz dieses Projekts, die Untersuchung von single nucleotide polymorphisms in Toll-like Rezeptoren bei Patienten nach Stammzelltransplantation, im Zusammenhang mit dem Risiko einer CMV-Reaktivierung bzw. Erkrankung ist vielversprechend. In Zukunft sind weitere Projekte mit mehr Patienten und der SNP-Analyse in anderen TLR und in weiteren an der Immunabwehr bedeutsamen Komponenten anzustreben. Mit der Absicht, den Ursachen für CMV-Reaktivierung und Erkrankung näher zu kommen, um die Patienten noch besser prophylaktisch betreuen zu können, auch im Hinblick auf eine gezieltere Spenderauswahl.

6. Anhang

6.1 Verteilung der Heterogenitäten für die einzelnen Patienten

A: Patienten ohne CMV-Reaktivierung

Tabelle 8 Verteilung der verschiedenen Allele auf die einzelnen Patienten, ohne CMV-Reaktivierung

TLR = Toll-like-Rezeptor rs = reference SNP

* = Patienten mit weiblichem Spender

W = Wildtyp M = heterologe Mutation M = homologe Mutation

Patienten (durchnummeriert)	TLR 9 rs 352140	TLR 8 rs 2407992	TLR 8 rs 3747414	TLR 8 rs 3764880
1*	W	hM	hM	W
2	W	W	W	W
3	hM	M	W	W
4*	W	hM	W	W
5	hM	W	W	W
6*	hM	M	M	hM
7*	M	hM	hM	W
8*	W	W	W	W
9*	W	hM	W	hM
10	M	W	W	W
11*	W	M	hM	W
12	hM	W	-	W
13*	hM	W	W	W
14*	hM	W	W	W
15*	hM	hM	W	hM
16*	hM	W	W	W
17	M	W	W	W
18	W	W	W	W
19	W	W	W	W
20*	W	hM	hM	W
21	M	W	W	W
22*	hM	hM	W	hM
23*	hM	W	W	W
24	hM	M	M	W
25*	hM	W	W	W
26*	hM	hM	hM	M
27*	W	M	M	M
28*	W	M	M	hM
29*	hM	W	W	W
30	W	W	W	W
31*	hM	W	W	W

32*	M	W	W	W
33	hM	W	W	M
34	hM	M	M	W
35*	hM	hM	hM	W
36	M	W	W	W
37	M	W	W	W
38*	M	W	M	W
39	M	M	W	W
40*	M	hM	hM	hM
41	W	M	M	W
42	W	M	W	M
43*	W	M	M	hM
44*	M	W	W	W
45*	hM	W	W	W
46*	hM	hM	M	hM
47	M	W	W	hM
48	hM	-	W	W
49	hM	W	W	W
50	hM	W	W	W
51	hM	W	W	W

B: Patienten mit CMV-Reaktivierung und Erkrankung

Tabelle 9 Verteilung der verschiedenen Allele auf die einzelnen Patienten, mit Erkrankung an CMV

TLR = Toll-like-Rezeptor rs = reference SNP

* = Patienten mit weiblichem Spender

W = Wildtyp M = heterologe Mutation hM = homologe Mutation

Patienten (durchnummeriert)	TLR 9 rs 352140	TLR 8 rs 2407992	TLR 8 rs 3747414	TLR 8 rs 3764880
1	hM	W	W	W
2*	M	M	hM	hM
3*	M	hM	hM	M
4*	W	W	W	hM
5	hM	M	W	W
6*	-	W	W	W
7	hM	W	W	W
8	M	W	W	M
9*	W	hM	W	W
10*	W	hM	hM	hM
11*	W	W	W	W
12*	hM	W	W	W
13	hM	M	W	W
14	W	W	W	W

15	W	W	W	W
16	M	W	W	W
17	hM	W	W	W
18	hM	W	W	M
19	hM	W	W	W
20*	W	M	M	W
21	hM	M	M	W
22	W	W	W	W
23	hM	W	W	W
24	hM	M	M	W
25*	W	hM	hM	hM
26*	hM	W	W	W

C: Patienten mit CMV-Reaktivierung ohne Erkrankung

Tabelle 10 Verteilung der verschiedenen Allele auf die einzelnen Patienten, mit CMV-Reaktivierung, ohne Erkrankung

TLR = Toll-like-Rezeptor rs = reference SNP

* = Patienten mit weiblichem Spender

W = Wildtyp M = heterologe Mutation M = homologe Mutation

Patienten (durchnummeriert)	TLR 9 rs 352140	TLR 8 rs 2407992	TLR 8 rs 3747414	TLR 8 rs 3764880
1	hM	W	W	W
2	hM	M	M	W
3	M	W	W	W
4	M	M	M	W
5	W	W	W	-
6	W	W	W	W
7	M	W	W	W
8	M	M	M	M
9*	W	hM	hM	W
10	W	W	W	W
11*	W	hM	hM	W
12	hM	W	W	W
13	hM	W	W	W
14	M	M	M	M
15	hM	M	W	W
16	W	M	M	M
17*	M	W	W	hM
18	M	W	W	W
19	W	W	W	W
20	hM	W	W	W
21*	hM	hM	hM	W
22	hM	M	M	W

23	hM	M	M	M
24*	hM	hM	hM	hM
25	M	W	W	W
26	M	M	M	W
27*	W	W	W	W
28	hM	M	M	M
29	M	W	W	W
30*	M	-	M	hM
31*	hM	hM	hM	hM
32	M	W	W	W
33*	M	hM	hM	M
34	W	-	W	M
35	M	M	M	M
36	hM	W	W	W
37	M	W	W	M
38	W	W	W	W
39	M	M	M	M
40	M	W	W	-
41*	hM	hM	hM	W
42	W	W	W	W
43	M	M	M	M
44	W	W	W	W
45*	hM	W	W	W
46	hM	M	M	W
47	hM	W	W	W
48	W	W	W	W
49	hM	W	W	W
50	hM	M	M	M
51	W	W	W	W
52	W	W	W	W
53	hM	M	M	W
54	hM	W	W	W
55*	W	-	W	W
56	W	W	W	W
57	hM	W	W	W
58	hM	W	W	W
59	hM	W	W	W
60*	M	W	W	W
61*	hM	hM	W	hM
62*	M	hM	hM	W
63	M	W	W	W
64	hM	W	W	W
65	hM	W	W	W
66	M	M	W	M
67	M	W	W	W
68	hM	M	M	M
69*	M	W	W	W

6.2 Übersicht über die klinischen Parameter

Tabelle 11 Verteilung der klinischen Parameter in absoluten Werten und Prozentzahlen

E = Empfänger S = Spender pos. = positiv neg. = negativ ATG = Anti-Thymozyten Globulin Bu = Busulfan
 CSA = Cyclosporin A CY = Cyclophosphamid Fu = Fludarabin KG = Körpergewicht MMF = Mycophenolat mofetil
 MTX = Methotrexat Pred = Prednisolon TBI = total body irradiation TT = Thiotepa VP = Vepesid-Phosphat

	Ohne CMV-Reaktivierung			CMV-Reaktivierung und erkrankt			CMV-Reaktivierung, nicht erkrankt		
	Gesamt: 51	Patienten mit weiblichen Spendern: 28	Patienten mit männl. Spendern: 23	Gesamt: 26	Patienten mit weiblichen Spendern: 11	Patienten mit männl. Spendern: 15	Gesamt: 69	Patienten mit weiblichen Spendern: 16	Patienten mit männlichen Spendern: 53
CMV-Serologie E/S									
pos. / pos.	15→29,4 %	10→35,7 %	5→21,7 %	16→61,5 %	7→63,6 %	9→60,0 %	47→68,1 %	7→43,8 %	40→75,5 %
pos. / neg.	11→21,6 %	4→14,3 %	7→30,5 %	6→23,1 %	3→27,3 %	3→20,0 %	16→23,2 %	7→43,8 %	9→17,0 %
neg. / pos.	25→49,0 %	14→50,0 %	11→47,8 %	2→7,7 %		2→13,3 %	5→7,2 %	2→12,5 %	3→5,7 %
Transplantationsmodalität									
familiär, identisch	30→58,8 %	18→64,3 %	12→52,2 %	9→34,6 %	6→54,5 %	3→20,0 %	36→52,2 %	7→43,8 %	29→54,7 %
familiär, mismatch	5→9,8 %	4→14,3 %	1→4,3 %	2→7,7 %	1→9,1 %	1→6,7 %	4→5,8 %	1→6,3 %	3→5,7 %
fremd, identisch	15→9,4 %	5→17,9 %	10→43,5 %	9→34,6 %	4→36,4 %	5→33,3 %	26→37,7 %	7→43,8 %	19→35,8 %
fremd, mismatch	1→2,0 %	1→3,6 %		6→23,1 %		6→40,0 %	3→4,3 %	1→6,3 %	2→3,8 %
Konditionierung									
Gruppe A:	5→9,8 %	3→10,7 %	2→8,7 %	3→11,5 %	1→9,1 %	2→13,3 %	9→13,0 %	2→12,5 %	7→13,2 %
TBI / ATG / FU							2→2,9 %		2→3,8 %
TBI / CY / FU	1→2,0 %		1→4,3 %						
TBI / CY / TT							1→1,5 %		1→1,9 %

FU / ATG / Treosulfan	1→2,0 %	1→3,6 %							
FU / CY / ATG	1→2,0 %	1→3,6 %							
FU / Melphalan							3→4,3 %	1→6,3 %	2→3,8 %
FU / Melphalan / ATG							1→1,5 %		1→1,9 %
FU / Treosulfan	1→2,0 %	1→3,6 %							
CY / Treosulfan				1→3,8 %		1→6,7 %			
Dexa-Meac	1→2,0 %		1→4,3 %	2→7,7 %	1→9,1 %	1→6,7 %	2→2,9 %	1→6,3 %	1→1,9 %
Gruppe B:	46→90,2 %	25→89,3 %	21→91,3 %	22→84,6 %	10→90,9 %	12→80,0 %	59→85,5 %	14→87,5 %	45→84,9 %
TBI	20→39,2 %	12→42,9 %	8→34,8 %	10→38,5 %	5→45,5 %	5→33,3 %	18→26,1 %	4→25,0 %	14→26,4 %
TBI / CY	7→13,7 %	4→14,3 %	3→13,0 %	6→23,1 %	3→27,3 %	3→20,0 %	11→15,9 %	4→25,0 %	7→13,2 %
TBI / CY / VP				1→3,8 %	1→9,1 %		4→5,8 %		4→7,5 %
TBI / CY / ATG	3→5,9 %	1→3,6 %	2→8,7 %	3→11,5 %		3→20,0 %	9→13,0 %	2→12,5 %	7→13,2 %
TBI / CY / Eto- pophosphamid							1→1,5 %		1→1,9 %
TBI / CY / VP / ATG							1→1,5 %		1→1,9 %
TBI / CY / ATG / TT				1→3,8 %		1→6,7 %			
BU / CY	9→17,6 %	5→17,9 %	4→17,4 %	1→3,8 %	1→9,1 %		9→13,0 %	2→12,5 %	7→13,2 %
BU / CY / TT	1→2,0 %		1→4,3 %				4→5,8 %	1→6,3 %	3→5,7 %
BU / CY / ATG	2→3,9 %	1→3,6 %	1→4,3 %				2→2,9 %	1→6,3 %	1→1,9 %
BU / CY / ATG / Radioimmunt.	1→2,0 %		1→4,3 %						
BU / CY / Alexan	1→2,0 %	1→3,6 %							
BU / CY / Ara-C	1→2,0 %		1→4,3 %						
BU / CY / Rhenium	1→2,0 %	1→3,6 %							
GvHD-Prophylaxe									
Gruppe A:	22→43,1 %	11→39,3 %	11→47,8 %	7→26,9 %	1→9,1 %	6→40,0 %	34→49,3 %	7→43,8 %	27→50,9 %
CSA,MTX, CD34 selek.	1→2,0 %	1→3,6 %							
CSA, MTX, ATG, CD34 unselek.				2→7,7 %		2→13,3%			
CSA, MTX, ATG							1→1,5 %	1→6,3 %	

CSA, CD 34 selek.	2→3,9 %	1→3,6 %	1→4,3 %						
CSA, CD34 unselek., OKT3	1→2,0 %	1→3,6 %					1→1,5 %		1→1,9 %
CSA, ATG	4→7,8 %	2→7,1 %	2→8,7 %	2→7,7 %	1→9,1 %	1→6,7 %	9→13,0 %	2→12,5 %	7→13,2 %
CSA, ATG,CD34 unsel.	7→13,7 %	3→10,7 %	4→17,4 %				7→10,1 %	1→6,3 %	6→11,3 %
CSA, ATG, CD34selek.							2→2,9 %		2→3,4 %
CSA, ATG CD 34 unselek, OKT3	1→2,0 %	1→3,6 %							
CSA, ATG selek. und unselek.	1→2,0 %		1→4,3 %						
CSA, ATG, Pred unsel.							1→1,5 %	1→6,3 %	
CSA, ATG, MMF, CD 34 unselek.	3→5,9 %	1→3,6 %	2→8,7 %	1→3,8 %		1→6,7 %	4→5,8 %	1→6,3 %	3→5,7 %
CSA, ATG, MMF, Pred				1→3,8 %		1→6,7 %	1→1,5 %		1→1,9 %
CSA, ATG, MMF, Pred, unselek.	1→2,0 %		1→4,3 %				1→1,5 %		1→1,9 %
CSA, ATG, MMF, Pred, CD34 selek.							1→1,5 %		1→1,9 %
ATG							2→2,9 %		2→3,4 %
ATG, CD34 selek.							1→1,5 %		1→1,9 %
ATG, CD 34 unselek.	1→2,0 %	1→3,6 %					2→2,9 %		2→3,4 %
CSA, ATG, Campath, CD 34 unselek.							1→1,5 %	1→6,3 %	
Campath				1→3,8 %		1→6,7 %			
Gruppe B:	28→54,9 %	17→60,7 %	11→47,8 %	18→69,2 %	10→90,9 %	8→53,3 %	32→46,4 %	8→50,0 %	24→45,3 %
CSA	1→2,0 %		1→4,3 %	1→3,8 %	1→9,1 %		5→7,2 %	1→6,3 %	4→7,5 %
CSA, Pred				1→3,8 %	1→9,1 %				
CSA, MTX	12→23,5 %	7→25,0 %	5→21,7 %	9→34,6 %	5→45,5 %	4→26,7 %	9→13,0 %	4→25,0 %	5→9,4 %
CSA,MTX,CD34unsel.	9→17,6 %	7→25,0 %	2→8,7 %	6→22,8 %	2→18,2 %	4→26,7 %	11→15,9 %	2→12,5 %	9→17,0 %
CSA, MTX, MMF							1→1,5 %		1→1,9 %
CSA, MMF, unselek.	1→2,0 %		1→4,3 %						
CSA, MTX, CD 34	1→2,0 %	1→3,6 %							

unselek. und selek.									
CSA, CD 34 unselek.	4→7,8 %	2→7,1 %	2→8,7 %				5→7,2 %	1→6,3 %	4→7,5 %
CSA, MTX, MMF, Pred, CD 34 unselek.							1→1,5 %		1→1,9 %
CD 34 unselek.				1→3,8 %	1→9,1 %				
Akute GvHD									
Grad 0 - I	38→74,5 %	20→71,4 %	18→78,3 %	13→50,0 %	3→27,3 %	10→66,7 %	48→69,6 %	6→37,5 %	42→79,2 %
Grad II - IV	13→25,5 %	8→28,6 %	5→21,7 %	13→50,0 %	8→72,7 %	5→33,3 %	21→30,4 %	10→62,5 %	11→20,8 %
Chronische GvHD									
ja	16→31,4 %	11→39,3 %	5→21,7 %	6→23,1 %	3→27,3 %	3→20,0 %	21→30,4 %	7→43,8 %	14→26,4 %
nein	27→52,9 %	12→42,9 %	15→65,2 %	14→53,8 %	3→27,3 %	11→73,3 %	39→56,5 %	7→43,8 %	32→60,4 %
ne	8→15,7 %	5→17,9 %	3→13,0 %	6→23,1 %	5→45,5 %	1→6,7 %	9→13,0 %	2→12,5 %	7→13,2 %
Kortikosteroide									
keine bis ≤ 2mg /kg KG	39→76,5 %	22→78,6 %	17→73,9 %	13→50,0 %	6→54,5 %	7→46,7 %	47→68,1 %	9→56,2 %	38→71,7 %
> 2 mg /kg KG	12→23,5 %	6→21,4 %	6→26,1 %	13→50,0 %	5→45,5 %	8→53,3 %	22→31,9 %	7→43,8 %	15→28,3 %
Neutropenie nach Tag 100									
ja	3→11,5 %	1→7,8 %	2→15,4 %	1→20,0 %	0→0%	1→33,3 %	12→29,3 %	4→50,0 %	8→24,2 %
nein	23→88,5 %	12→92,3 %	11→84,6 %	4→80,0 %	2→100,0 %	2→66,7 %	29→70,7 %	4→50,0 %	25→75,8 %
Lymphopenie nach 3 Monaten (< 200/µl)									
ja	3→11,5 %	1→7,8 %	2→15,4 %	2→40,0 %	1→50,0 %	1→33,3 %	4→9,8 %	1→12,5 %	3→9,1 %
nein	23→88,5 %	12→92,3 %	11→84,6 %	3→60,0 %	1→50,0 %	2→66,7 %	37→90,2 %	7→87,5 %	30→90,9 %
Outcome									
lebend	33→64,7 %	18→64,3 %	15→65,2 %	7→26,9 %	2→18,2 %	5→33,3 %	43→62,3 %	8→50,0 %	35→66,0 %
verstorben	18→35,3 %	10→35,7 %	8→34,8 %	19→73,1 %	9→81,8 %	10→66,7 %	26→37,7 %	8→50,0 %	18→44,0 %

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
Tabelle 1	Übersicht der in der Arbeit verwendeten SNPs	16
Tabelle 2	Patientencharakteristika und Diagnosen	19
Tabelle 3	Übersicht über die verwendeten Primer und Sonden	27
Tabelle 4	Auswertung der klinischen Parameter zwischen weiblichen und männlichen Spendern, ohne CMV-Reaktivierung	62
Tabelle 5	Auswertung der klinischen Parameter zwischen weiblichen und männlichen Spendern, mit CMV-Reaktivierung	63
Tabelle 6	Auswertung der klinischen Parameter zwischen weiblichen und männlichen Spendern, mit CMV-Reaktivierung und Erkrankung	64
Tabelle 7	Auswertung der klinischen Parameter zwischen weiblichen und männlichen Spendern, mit CMV-Reaktivierung ohne CMV-Erkrankung	65
Tabelle 8	Verteilung der verschiedenen Allele auf die einzelnen Patienten, ohne CMV-Reaktivierung	79
Tabelle 9	Verteilung der verschiedenen Allele auf die einzelnen Patienten, mit Erkrankung an CMV	80
Tabelle 10	Verteilung der verschiedenen Allele auf die einzelnen Patienten, mit CMV-Reaktivierung, ohne Erkrankung	81
Tabelle 11	Verteilung der klinischen Parameter mit absoluten Werten und Prozentzahlen	83

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
Abbildung 1	Das LightCycler Instrument	22
Abbildung 2	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)	23
Abbildung 3	Darstellung der Schmelzkurve und des dazugehörigen Schmelzpunkts	24
Abbildung 4	Analyse einer bzw. von zwei Mutationen mit einem Farbstoff LC Red 640)	26
Abbildung 5	Analyse von zwei Mutationen mit zwei Farbstoffen (LC Red 640 und LC Red 705)	26
Abbildung 6	Gleichseitiges Dreieck mit den Loten u, v und w	32
Abbildung 7	Darstellung der Schmelzkurve für TLR9, rs 352140	35
Abbildung 8	Darstellung der Schmelzkurve für TLR8, rs 2407992	38
Abbildung 9	Prozentualer Anteil der Allele für die einzelnen Patientengruppen mit weiblichen Spendern, rs 2407992	39
Abbildung 10	Prozentualer Anteil der Allele für die einzelnen Patientengruppen mit männlichen Spendern, rs 2407992	39
Abbildung 11	Darstellung der Schmelzkurve für TLR8, rs 3747414	42
Abbildung 12	Prozentualer Anteil der Allele für die einzelnen Patientengruppen mit weiblichen Spendern, rs 3747414	43
Abbildung 13	Prozentualer Anteil der Allele für die einzelnen Patientengruppen mit männlichen Spendern, rs 3747414	43
Abbildung 14	Darstellung der Schmelzkurve für TLR8, rs 3747414	46
Abbildung 15	Darstellung der Schmelzkurve für TLR8 I, rs 3747414	46
Abbildung 16	Darstellung der Schmelzkurve für TLR8 II, rs 3764880	47
Abbildung 17	Prozentualer Anteil der Allele für die einzelnen Patientengruppen mit weiblichen Spendern, rs 3764880	48
Abbildung 18	Prozentualer Anteil der Allele für die einzelnen Patientengruppen mit männlichen Spendern, rs 3764880	48
Abbildung 19	Darstellung der Schmelzkurve für TLR8, rs 574077	51
Abbildung 20	Darstellung der Schmelzkurve für TLR8, rs 5743842	51
Abbildung 21	Darstellung der Schmelzkurve für TLR8, rs 3775291	52
Abbildung 22	Darstellung der Schmelzkurve für TLR8, rs 5743318	52
Abbildung 23	Prozentualer Anteil der Verteilung der CMV-Serologie für alle Patienten	53
Abbildung 24	Prozentualer Anteil der Verteilung der Transplantationsmodalität für alle Patienten	54
Abbildung 25	Prozentualer Anteil der Verteilung der verschiedenen Konditionierungstherapien für alle Patienten	55

Abbildung	26	Prozentualer Anteil der Verteilung der verschiedenen GvHD-Prophylaxen für alle Patienten	56
Abbildung	27	Prozentualer Anteil der Verteilung der akuten GvHD-Grade für alle Patienten	57
Abbildung	28	Prozentualer Anteil der Verteilung des Vorkommens einer Chronischen GvHD für alle Patienten	58
Abbildung	29	Prozentualer Anteil der Verteilung der Verteilung der Kortikosteroiddosen für alle Patienten	59
Abbildung	30	Prozentualer Anteil des Überlebens für alle Patienten	61

9. Literaturverzeichnis

- [1] Alexopoulou L., Holt A.C., Medzhitov R., Flavell R.A. (2001)
Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3.
Nature, 413: 732-738
- [2] Anderson J.E., Appelbaum F.R. (1997)
Myelodysplasia and myeloproliferative disorders.
Curr Opin Hematol, 4: 261-267
- [3] Apperley J.F., Goldman J.M. (1988)
Cytomegalovirus: biology, clinical features and methods for diagnosis.
Bone Marrow Transplant, 3: 253-264
- [4] Atkinson K. (1990)
Reconstruction of the haemopoietic and immune systems after marrow transplantation.
Bone Marrow Transplant, 5: 209-226
- [5] Bacigalupo A., Tedone E., Sanna M.A., Moro F., Van Lint M.T., Grazi G., Balestreri M., Frassoni F., Occhini D., Gualandi F. (1992)
CMV infection following allogeneic BMT: risk factors, early treatment and correlation with transplant related mortality.
Haematologica, 77: 507-513
- [6] Bauer S., Kirschning C.J., Häcker H., Redecke V., Hausmann S., Akira S., Wagner H., Lipford G.B. (2001)
Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition.
Proc Natl Acad Sci USA, 98: 9237-9242
- [7] Bearman S.I., Appelbaum F.R., Back A., Petersen F.B., Buckner C.D., Sullivan K.M., Schoch H.G., Fisher L.D., Thomas E.D. (1989)
Regimen-related toxicity and early posttransplant survival in patients undergoing marrow transplantation for lymphoma.
J Clin Oncol, 7: 1288-1294
- [8] Bensinger W.I., Weaver C.H., Appelbaum F.R., Rowley S., Demirer T., Sanders J., Storb R., Buckner C.D. (1995)
Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor.
Blood, 85: 1655-1658

- [9] Bornhauser M., Platzbecker U., Theuser C., Holig K., Ehninger G. (2002)
CD34+-enriched peripheral blood progenitor cells from unrelated donors for allografting of adult patients: high risk of graft failure, infection and relapse despite donor lymphocyte add-back.
Br J Haematol, 118: 1095-1103
- [10] Bornhauser M., Schuler U., Porksen G., Naumann R., Geissler G., Thiede C., Schwerdtfeger R., Ehninger G., Thiede H.M. (1999)
Mycophenolate mofetil and cyclosporine as graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic blood stem cell transplantation.
Transplantation, 67: 499-504
- [11] Bortin M.M. (1970)
A compendium of reported human bone marrow transplants.
Transplantation, 9: 571-587
- [12] Broers A.E., van Der Holt R., van Esser J.W., Gratama J.W., Henzen-Logmans S., Kuenen-Boumeester V., Lowenberg B., Cornelissen J.J. (2000)
Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV-seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation.
Blood, 95: 2240-2245
- [13] Cannings C., Edwards A.W.F. (1968)
Natural selection and the de Finetti diagram.
Ann Hum Genet, 31: 421-428
- [14] Casteels A., Naessens A., Gordts F., De Catte L., Bougatef A., Foulon W. (1999)
Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infections.
J Perinat Med, 27: 116-121
- [15] Clayton D.
Population Association
In: Balding D.J., Bishop M., Cannings C.
Handbook of Statistical Genetics (2001)
John Wiley & Sons, Ltd Weinheim 519-540
- [16] Clegg R.M. (1995)
Fluorescence resonance energy transfer.
Curr Opin Biotechnol, 6: 103-110

- [17] Deeg H.J., Lin D., Leisenring W., Boeckh M., Anasetti C., Appelbaum F.R., Chauncey T.R., Doney K., Flowers M., Martin P., Nash R., Schoch G., Sullivan K.M., Witherspoon R.P., Storb R. (1997)
Cyclosporine or cyclosporine plus methylprednisolone for prophylaxis of graft-versus-host disease a prospective, randomized trial.
Blood, 89: 3880-3887
- [18] Deeg H.J., Storb R. (1984)
Graft-versus-host disease: pathophysiological and clinical aspects.
Annu Rev Med, 35: 11-24
- [19] Dupont B., Hansen J.A. (1978)
Donor selection for bone marrow transplantation: the predictive value of HLA-D typing for MLR compatibility between unrelated individuals.
Transplant Proc, 1: 53-56
- [20] Einsele H., Ehninger G., Steidle M., Fischer I., Bihler S., Gerneth F., Vallbracht A., Schmidt H., Waller H.D., Muller C.A. (1993)
Lymphocytopenia as an unfavorable prognostic factor in patients with cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation.
Blood, 82: 1672-1678
- [21] Epstein R.B., Storb R., Ragde H., Thomas E.D. (1968)
Cytotoxic typing antisera for marrow grafting in littermate dogs.
Transplantation, 6: 45-58
- [22] Evans D., Buchwald A., Beil F.U. (2003)
The single nucleotide polymorphism -1131T>C in the apolipoprotein A5 (APOA5) gene is associated with elevated triglycerides in patients with hyperlipidemia.
J Mol Med, 81: 645-654
- [23] Ferrara J.L.M., Antin J.H.
The pathophysiology of Graft-versus-Host Disease.
In: Thomas E.D., Blume K., Forman S.J., eds.
Hematopoietic cell transplantation. (1998)
Malden: Blackwell Sciences, 305-315
- [24] Fitzgerald K.A., Palsson-McDermott E.M., Bowie A.G., Jefferies C.A., Mansell A.S., Brady G., Brint E., Dunne A., Gray P., Harte M.T., McMurray D., Smith D.E., Sims J.E., Bird T.A., O'Neill L.A. (2001)
Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction.
Nature, 413: 78-83

- [25] Gahrton G., Tura S., Ljungman P., Belanger C., Brandt L., Cavo M., Facon T., Granena A., Gore M., Gratwohl A. (1991)
Allogeneic bone marrow transplantation in multiple myeloma. European Group for Bone Marrow Transplantation.
N Engl J Med, 325: 1267-1273
- [26] Gale R.P., Kay H.E., Rimm A.A., Bortin M.M. (1982)
Bone-marrow transplantation for acute leukemia in first remission.
Lancet, 2: 1006-1009
- [27] Gambaro G., Anglani F., D'Angelo A. (2000)
Association studies of genetic polymorphisms and complex disease.
Lancet, 355: 308-311
- [28] Gianni A.M., Siena S., Bregni M., Tarella C., Stern A.C., Pileri A., Bonadonna G. (1989)
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating haemopoietic stem cells for autotransplantation.
Lancet, 2: 580-585
- [29] Gibson W.
Cytomegalovirus molecular biology (human)
In: Webster R.G., Granoff A. (1999)
Encyclopedia of virology, vol. 1, Academic Press, 299-304
- [30] Gingrich R.D., Howe C.W., Goeken N.E., Ginder G.D., Kugler J.W., Tewfik H.H., Klassen L.W., Armitage J.O., Fyfe M.A. (1985)
The use of partially matched, unrelated donors in clinical bone marrow transplantation.
Transplantation, 39: 526-532
- [31] Goodgame R.W. (1993)
Gastrointestinal cytomegalovirus disease.
Ann Intern Med, 119: 924-935
- [32] Gratwohl A., Hermans J. (1994)
EBMT survey on bone marrow transplant activity in Europe: regional differences.
Bone Marrow Transplant, 13: 683-688
- [33] Grob J.P., Grundy J.E., Prentice H.G., Griffiths P.D., Hoffbrand A.V., Hughes M.D., Tate T., Wimperis J.Z., Brenner M.K. (1987)
Immune donors can protect marrow-transplant recipients from severe cytomegalovirus infections.
Lancet, 1: 774-776

- [34] Hashimoto C., Hudson K.L., Anderson K.V. (1988)
The Toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein.
Cell, 52: 269-279
- [35] Hatada E.N., Krappmann D., Scheidereit C. (2000)
NF- κ B and the innate immune response.
Curr Opin Immunol, 12: 52-58
- [36] Hebart H., Ehninger G., Schmidt H., Berner B., Reuss-Borst M., Waller H.D., Muller C.A., Einsele H. (1995)
Treatment of steroid-resistant graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation with anti-CD3/TCR monoclonal antibodies.
Bone marrow transplantation, 15: 891-894
- [37] Hebart H., Kanz L., Jahn G., Einsele H. (1998)
Management of cytomegalovirus infection after solid-organ or stem-cell transplantation. Current guidelines and future prospects.
Drugs, 55: 59-72
- [38] Heil F., Hemmi H., Hochrein H., Ampenberger F., Kirschning C., Akira S., Lipford G., Wagner H., Bauer S. (2004)
Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8.
Science, 303: 1526-1529
- [39] Hows J.M., Marsh J.C., Yin J.L., Durrant S., Swirsky D., Worsley A., Fairhead S.M., Chipping P.M., Palmer S., Gordon Smith E.C. (1989)
Bone marrow transplantation for severe aplastic anaemia using cyclosporin: long-term follow-up.
Bone Marrow Transplant, 4: 11-16
- [40] Jacobson L.O., Simmons E.L., Marks E.K., Eldredge J.H. (1951)
Recovery from radiation injury.
Science, 113: 510-511
- [41] Kadowaki N., Ho S., Antonenko S., Malefyt R.W., Kastelein R.A., Bazan F., Liu Y.J. (2001)
Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens.
J Exp Med, 194: 863-869
- [42] Kellogg D.E., Rybalkin I., Chen S., Mukhamedova N., Vlasik T., Siebert P.D., Chenchik A. (1994)
TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing antibody directed against Taq DNA polymerase.
Biotechniques, 16: 1134-1137

- [43] Krutzik S.R., Sieling P.A., Modlin R.L. (2001)
The role of Toll-like receptors in host defense against microbial infection.
Curr Opin Immunol, 13: 104-108
- [44] Kyger E.M., Krevolin M.D., Powell M.J. (1998)
Detection of the hereditary hemochromatosis gene mutation by real-time fluorescence polymerase chain reaction and peptide nucleic acid clamping.
Anal Biochem, 260: 142-148
- [45] Lay M.J., Wittwer C.T. (1997)
Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR.
Clin Chem, 43: 2262-2267
- [46] Lazarus R., Raby B.A., Lange C., Silverman E.K., Kwiatkowski D.J., Vercelli D., Klimecki W.J., Martinez F.D., Weiss S.T. (2004)
Toll-like Receptor 10 (TLR10) genetic variation is associated with asthma in two independent samples.
Am J Respir Crit Care Med, [Epub ahead of print]
- [47] Lewin B.
Genes VII. (2000)
Oxford University press, Oxford
- [48] Linch D.C., Winfield D., Goldstone A.H., Moir D., Hancock B., McMillan A., Chopra R., Milligan D., Hudson G.V. (1993)
Dose intensification with autologous bone-marrow transplantation in relapsed and resistant Hodgkin's disease: results of a BNLI randomised trial.
Lancet, 341: 1051-1054
- [49] Ljungman P. (1995)
Cytomegalovirus pneumonia: presentation, diagnosis, and treatment.
Semin Respir Infect, 10: 209-215
- [50] Ljungmann P., Aschan J., Lewensohn-Fuchs I., Carlens S., Larsson K., Lonnqvist B., Mattsson J., Sparrelid E., Winiarski J., Ringden O. (1998)
Results of different strategies for reducing cytomegalovirus-associated mortality in allogeneic stem cell transplant recipients.
Transplantation, 66: 1330-1334

- [51] Ljungmann P., Brand R., Einsele H., Frassoni F., Niederwieser D., Cordonnier C. (2003)
Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis.
Blood, 102: 4255-4260
- [52] Loeffler J., Henke N., Hebart H., Schmidt D., Hagemeyer L., Schumacher U., Einsele H. (2000)
Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the Light Cycler system.
J Clin Microbiol, 38: 586-590
- [53] Lorenz E., Uphoff D., Reid T.R., Shelton E. (1951)
Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections.
J Natl Cancer Inst, 12: 197-201
- [54] Lund J., Sato A., Akira S., Medzhitov R., Iwasaki A. (2003)
Toll-like receptor 9-mediated recognition of herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells.
J Exp Med, 3: 513-520
- [55] McDonald G.B., Sharma P., Matthews D.E., Shulman H.M., Thomas E.D. (1984)
Venocclusive disease of the liver after bone marrow transplantation: diagnosis, incidence, and predisposing factors.
Hepatology, 4: 116-122
- [56] McPherson J.D., Marra M., Hillier L., Waterston R.H., Chinwalla A., Wallis J., Sekhon M., Wylie K., Mardis E.R., Wilson R.K., et al (2001)
A physical map of the human genome.
Nature, 409: 934-941
- [57] Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. Jr. (1997)
A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity.
Nature, 388: 394-397
- [58] Meyers J.D., Flournoy N., Thomas E.D. (1986)
Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation.
J Infect Dis, 153: 478-488

- [59] Mocarski E.S.Jr.
Cytomegalovirus general features (human)
In: Webster R.G., Granoff A. (1999)
Encyclopedia of virology, vol. 1, Academic Press, 292-298
- [60] Modrow S., Falke D.
Das humane Cytomegalievirus.
In: Molekulare Virologie (1998)
Spektrum, Akademischer Verlag, Kapitel 18: 450-453
- [61] Mothy M., Bay J.O., Faucher C., Choufi B., Bilger K., Tounilhac O., Vey N., Stoppa A.M., Coso D., Chabannon C., Viens P., Maraninchi D., Blaise D. (2003)
Graft-versus host disease following allogeneic transplantation from HLA-identical sibling with antithymocyte globulin-based reduced-intensity preparative regimen.
Blood, 102: 470-476
- [62] Muzio M., Bosisio D., Polentarutti N., D'amico G., Stoppacciaro A., Mancinelli R., van't Veer C., Penton-Rol G., Ruco L.P., Allavena P., Mantovani A. (2000)
Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells.
J Immunol, 164: 5998-6004
- [63] NCBI: National Center for Biotechnology Information
U.S. National Library of Medicine
<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>
- [64] Ordemann R., Holig K., Wagner K., Rautenberg U., Bornhauser M., Kroschinsky F., Schafer J., Schuler U., Ehninger G. (1998)
Acceptance and feasibility of peripheral stem cell mobilisation compared to bone marrow collection from healthy unrelated donors.
Bone Marrow Transplant, 21 Suppl 3: S25-28
- [65] Parkman R., Weinberg K.I. (1997)
Immunological reconstitution following bone marrow transplantation.
Immunol Rev, 157: 73-78
- [66] Reusser P., Attenhofer R., Hebart H., Helg C., Chapuis B., Einsele H. (1997)
Cytomegalovirus-specific T-cell immunity in recipients of autologous peripheral blood stem cell or bone marrow transplants.
Blood, 89: 3873-3879

- [67] Ringden O., Remberger M., Runde V., Bornhauser M., Blau I.W., Basara N., Holig K., Beelen D.W., Hagglund H., Basu O., Ehninger G., Fauser A.A. (1999)
Peripheral blood stem cell transplantation from unrelated donors: a comparison with marrow transplantation.
Blood, 94: 455-464
- [68] Ririe K.M., Rasmussen R.P., Wittwer C.T. (1997)
Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction.
Anal Biochem, 245: 154-160
- [69] Russell N.H., Gratwohl A., Schmitz N. (1996)
The place of blood stem cells in allogeneic transplantation.
Br J Haematol, 93: 747-753
- [70] Sachs L.
Weitere Prüfverfahren.
In: *Angewandte Statistik, Anwendung statistischer Methoden* (2003)
Springer, Berlin Heidelberg Kapitel 4: 478-481
- [71] Saito T., Ji G., Shinzawa H., Okumoto K., Hattori E., Adachi T., Takeda T., Sugahara K., Ito J.I., Watanabe H., Saito K., Togashi H., Ishii K., Matsuura T., Inageda K., Muramatsu M., Kawata S. (2004)
Genetic variations in humans associated with differences in the course of hepatitis C.
Biochem Biophys Res Commun, 317: 335-341
- [72] Sasieni P.D. (1997)
From genotypes to genes: doubling the sample size.
Biometrics, 53: 1253-1261
- [73] Schaefer U.W., Beelen D.W.
Knochenmarktransplantation. (1989)
Karger, München
- [74] Schmitz N., Dreger P., Suttorp M., Rohwedder E.B., Haferlach T., Löffler H., Hunter A., Russell N.H. (1995)
Primary transplantation of allogeneic peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor).
Blood, 85: 1666-1672
- [75] Schoppel K., Schmidt C., Einsele H., Hebart H., Mach M. (1998)
Kinetics of the antibody response against human cytomegalovirus-specific proteins in allogeneic bone marrow transplant recipients.
J Infect Dis, 178: 1233-1243

- [76] Storb R., Deeg H.J., Pepe M., Doney K., Appelbaum F., Beatty P., Bensinger W., Buckner C.D., Clift R., Hansen J. (1989)
Graft-versus-host disease prevention by methotrexate combined with cyclosporin compared to methotrexate alone in patients given marrow grafts for severe aplastic anaemia: long-term follow-up of a controlled trial.
Br J Haematol, 72: 567-572
- [77] Storb R., Rudolph R.H., Thomas E.D. (1971)
Marrow grafts between canine siblings matched by serotyping and mixed leukocyte culture.
J Clin Invest, 50: 1272-1275
- [78] Storb R., Thomas E.D. (1983)
Allogenic bone-marrow transplantation.
Immunol Rev, 71: 77-102
- [79] Strachan T., Read A.P.
Molekulare Humangenetik.
Spektrum, Akademischer Verlag, Berlin Heidelberg (1996)
- [80] Sullivan K.M., Storb R., (1984)
Allogeneic marrow transplantation.
Cancer Invest, 2: 27-38
- [81] Tabet K., Georgel P., Janssen E., Du X., Hoebe K., Crozat K., Mudd S., Shamel L., Sovath S., Goode J., Alexopoulou L., Flavell R.A., Beutler B. (2004)
Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection.
Proc Natl Acad Sci U S A, 101: 356-3521
- [82] Takeda K., Kaisho T., Akira S. (2003)
Toll-like receptors.
Annu Rev Immunol, 21 : 335-376
- [83] Tantisira K., Klimecki W.T., Lazarus R., Palmer L.J., Raby B.A., Kwiatkowski D.J., Silverman E., Vercelli D., Martinez F.D., Weiss S.T. (2004)
Toll-like receptor 6 gene (TLR6): single-nucleotide polymorphism frequencies and preliminary association with the diagnosis of asthma.
Genes Immun, 5: 343-346
- [84] Tariverdian G., Buselmaier W.
Humangenetik (1999)
Springer, Berlin Heidelberg

- [85] Thomas E.D. (1982)
The role of marrow transplantation in the eradication of malignant disease.
Cancer, 49: 1963-1969
- [86] Thomas E.D., Buckner C.D., Banaji M., Clift R.A., Fefer A., Flournoy N., Goodell B.W., Hickman R.O., Lerner K.G., Neiman P.E., Sale G.E., Sanders J.E., Singer J., Stevens M., Storb R., Weiden P.L. (1977)
One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogenic marrow transplantation.
Blood, 49: 511-533
- [87] Thomas E.D., Buckner C.D., Rudolph R.H., Fefer A., Storb R., Neiman P.E., Bryant J.I., Chard R.L., Clift R.A., Epstein R.B., Fialkow P.J., Funk D.D., Giblett E.R., Lerner K.G., Reynolds F.A., Slichter S. (1971)
Allogenic marrow grafting for hematologic malignancy using HL-A matched donor-recipient sibling pairs.
Blood, 3: 267-287
- [88] Thomas E.D., Lochte H.L., Lu W.C., Ferrebee J.W. (1957)
Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy.
N Engl J Med, 257: 491-496
- [89] Thomas E.D., Sanders J.E., Flournoy N., Johnson F.L., Buckner C.D., Clift R.A., Fefer A., Goodell B.W., Storb R., Weiden P.L. (1983)
Marrow transplantation for patients with acute lymphoblastic leukemia: a long-term follow-up.
Blood, 62: 1139-1141
- [90] Thomas E.D., Storb R., Clift R.A., Fefer A., Johnson F.L., Neiman P.E., Lerner K.G., Glucksberg H., Buckner C.D. (1975)
Bone-marrow Transplantation.
N Engl J Med, 292: 832-843; 895-902
- [91] Van Ommen G.J. (2002)
The Human Genome Project and the future diagnostics, treatment and prevention.
J Inherit Metab Dis, 25: 183-188
- [92] Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G., Smith H.O., Yandell M., Evans C.A., Holt R.A., et al (2001)
The sequence of the human genome.
Science, 291: 1304-1351

- [93] Visse B., Dumont B., Huraux J.M., Fillet A.M. (1998)
Single amino acid change in DNA polymerase is associated with foscarnet resistance in a varicella zoster virus strain recovered from a patient with AIDS.
J Infect Dis, 178 : Suppl1 : S55-57
- [94] Vogelsang G.B., Wagner J.E. (1990)
Graft-versus-host disease.
Bone Marrow Transplant, 4: 625-639
- [95] Von Ahsen N., Schütz E., Armstrong V.W., Oellerich M. (1999)
Rapid detection of prothrombotic mutations of prothrombin (G20210A), Factor V (G1691A), and methylenetetrahydrofolate reductase (C677t) by real-time fluorescence PCR with the LightCycler.
Clin Chem, 45: 694-696
- [96] Vose J.M., Anderson J.R., Kessinger A., Bierman P.J., Coccia P., Reed E.C., Gordon B., Armitage J.O. (1993)
High-dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem-cell transplantation for aggressive non-Hodgkin's lymphoma.
J Clin Oncol, 11: 1846-1851
- [97] Wald A., Leisenring W., van Burik J.A., Bowden R.A. (1997)
Epidemiology of aspergillus infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation.
J Infect Dis, 175: 1459-1466
- [98] Weiner R.S., Bortin M.M., Gale R.P., Gluckman E., Kay H.E., Kolb H.J., Hartz A.J., Rimm A.A. (1986)
Interstitial pneumonitis after bone marrow transplantation. Assessment of risk factors.
Ann Intern Med, 104: 168-175
- [99] Wingard J.R., Piantadosi S., Burns W.H., Zahurak M.L., Santos G.W., Saral R. (1990)
Cytomegalovirus infections in bone marrow transplant recipients given intensive cytoreductive therapy.
Rev Infect Dis, 12 Suppl 7: S793-804
- [100] Wittwer C.T., Garling D.J. (1991)
Rapid cycle DNA amplification : time and temperature optimization.
Biotechniques, 10: 76-83
- [101] Wittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., Rasmussen R.P. (1997)
Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA Amplification.
Biotechniques, 22: 130-138

- [102] Zhang D., Zhang G., Hayden M.S., Greenblatt M.B., Bussey C., Flavell R.A., Ghosh S. (2004)
A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria.
Science, 303: 1522-1526
- [103] Zheng S.L., Augustsson-Balter K., Chan B., Hedelin M., Li L., Adami H.O., Bensen J., Li G., Johnsson J.E., Turner A.R., Adams T.S., Meyers D.A., Isaacs W.B., Xu J., Gronberg H. (2004)
Sequence variants of toll-like receptor 4 are associated with prostate cancer risk: results from cancer prostate in sweden study.
Cancer Res, 64: 2918-2922

Auszüge dieser Arbeit wurden in Form eines Posters veröffentlicht:
ICAAC (Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy) im
Oktober/November 2004 (Washington)
ASH (American Society of Hematology) im Dezember 2004 (San Diego)

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben, insbesondere gilt mein Dank:

Herrn Prof. Dr. med. Hermann Einsele für die Möglichkeit in seiner Abteilung zu promovieren und für die Überlassung des Themas

Herrn PD Dr. rer. nat. Jürgen Löffler für die gute Zusammenarbeit, für nützliche Ratschläge und für eine gute Atmosphäre im Labor

Herrn Dr. med. Michael Steffens für die wertvolle Hilfe bei der statistischen Auswertung und für viele nützliche Ratschläge

Herrn PD Dr. med. Holger Hebart für fachliche Anmerkungen

Marija Markulin und Ingrid Kumbier für eine umfangreiche Einarbeitung und Hilfsbereitschaft im Labor

Meiner Familie, meinen Freunden, Tobias Dais und allen ungenannten Personen für ihre Motivation und ausdauernde Unterstützung.

Lebenslauf

Claudia Sabrina Semmler
geboren am 14. Mai 1980 in Stuttgart

Schulausbildung:	1986 – 1990	Breitwiesenschule Gerlingen
	1990 – 1999	Gymnasium Gerlingen
		Allgemeine Hochschulreife
Hochschulausbildung:	1999 – 2006	Humanmedizin an der Eberhardt-Karls- Universität Tübingen
	04.09. 2001	Ärztliche Vorprüfung
	29.08. 2002	1. Staatsexamen
	31.03. 2005	2. Staatsexamen
	10.05. 2006	3. Staatsexamen
Praktisches Jahr:	1. Terial	Innere Medizin im Robert-Bosch- Krankenhaus Stuttgart
	2. Terial	Chirurgie im Universitätsspital Zürich
	3. Terial	Anästhesie im Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart