

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

**Die Rolle von Zytokinkinetik im Vergleich zum Einfluss  
klinischer Risikofaktoren bei Aspergillose und CMV**

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

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

**vorgelegt von  
Eva-Maria Arlt  
aus Bretten**

**2008**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Einsele

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. U. Schumacher

## **Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit**

**INHALTSVERZEICHNIS**

**EINLEITUNG**..... 1

**1 EINFÜHRUNG**..... 1

**1.1 SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMEN (SNP)**..... 1

        1.1.1 **DEFINITION**..... 1

        1.1.2 **AUSWAHL DER SNP**..... 4

            1.1.2.1 **ALLGEMEINE KRITERIEN**..... 4

            1.1.2.2 **BRADFORD-HILL-KRITERIEN**..... 5

            1.1.2.3 **VALIDIERUNG BY FREQUENCY**..... 6

            1.1.2.4 **ALLELHÄUFIGKEIT**..... 6

            1.1.2.5 **LITERATUR**..... 6

            1.1.2.6 **AUSGEWÄHLTE SNPS**..... 6

**1.2 INFEKTIÖSE KOMPLIKATIONEN NACH STAMMZELL-  
TRANSPLANTATION**..... 11

        1.2.1 **FRÜHE POSTTRANSPLANTATIONSPHASE (PREENGRAFTMENT)**..... 11

        1.2.2 **INTERMEDIÄRE POSTTRANSPLANTATIONSPHASE (VON DER  
HÄMATOPOETISCHEN REKONSTITUTION BIS TAG +100 NACH  
TRANSPLANTATION)** ..... 14

        1.2.3 **SPÄTE POSTTRANSPLANTATIONSPHASE (AB TAG +100 NACH  
TRANSPLANTATION)** ..... 15

**1.3 ASPERGILLOSE**..... 16

        1.3.1 **EPIDEMIOLOGIE**..... 16

            1.3.1.1 **INZIDENZ**..... 16

            1.3.1.2 **LETALITÄT**..... 16

        1.3.2 **ÄTIOLOGIE**..... 17

            1.3.2.1 **ERREGER UND INFektionsQUELLEN**..... 17

            1.3.2.2 **PATIENTENGRUPPEN**..... 17

            1.3.2.3 **KRANKHEITSBILDER**..... 20

                1.3.2.3.1 **INVASIVE ASPERGILLOSE**..... 20

                1.3.2.3.2 **ALLERGISCHE BRONCHOPULMONALE  
ASPERGILLOSE**..... 22

                1.3.2.3.3 **ASPERGILLOM**..... 22

        1.3.3 **PATHOGENESE**..... 22

<b>1.3.4</b>	<b>KLINISCHE RISIKOFAKTOREN</b> .....	<b>24</b>
<b>1.3.5</b>	<b>DIAGNOSE</b> .....	<b>25</b>
1.3.5.1	DIAGNOSTIK-PROGRAMM.....	25
1.3.5.1.1	SCREENING VOR EINER MANIFESTATION ODER INFEKTION.....	25
1.3.5.1.2	DIAGNOSTISCHES VORGEHEN BEI FEBRILER NEUTROPENIE.....	26
1.3.5.2	SYMPTOMATIK DER INVASIVEN ASPERGILLOSE.....	31
1.3.5.3	LABORCHEMISCHE BEFUNDE UND BLUTBILD.....	32
1.3.5.4	SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	32
1.3.5.4.1	NACHWEIS VON ANTIKÖRPERN.....	34
1.3.5.4.2	NACHWEIS VON ZIRKULIERENDEM GALAKTOMANNAN/GM.....	34
1.3.5.4.3	NACHWEIS VON ZIRKULIERENDEM (1-->3)- $\beta$ -D- GLUKAN.....	35
1.3.5.4.4	NACHWEIS VON ASPERGILLUS-DNA MITTELS PCR.....	35
1.3.5.5	MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG.....	36
1.3.5.6	LUNGENBIOPSIE.....	37
1.3.5.7	BILDGEBENDE VERFAHREN.....	37
<b>1.3.6</b>	<b>PROPHYLAXE UND THERAPIE</b> .....	<b>39</b>
<b>1.4</b>	<b>CYTOMEGALOVIRUS</b> .....	<b>40</b>
<b>1.4.1</b>	<b>EPIDEMIOLOGIE</b> .....	<b>40</b>
1.4.1.1	INZIDENZ.....	40
1.4.1.2	LETALITÄT.....	41
<b>1.4.2</b>	<b>ÄTIOLOGIE</b> .....	<b>41</b>
1.4.2.1	ERREGER .....	41
1.4.2.2	PATIENTENGRUPPEN.....	44
1.4.2.2.1	PRÄNATALE INFEKTION.....	44
1.4.2.2.2	POSTNATALE INFEKTION.....	45
1.4.2.2.2.1	INFEKTION EINES IMMUNKOMPETENTEN WIRTS.....	45
1.4.2.2.2.2	INFEKTION EINES IMMUNSUPPRIMIERTEN WIRTS.....	45
1.4.2.3	KRANKHEITSBILDER.....	47
1.4.2.3.1	DIE PRIMÄRINFEKTION.....	47
1.4.2.3.2	REAKTIVIERUNG.....	48

1.4.2.3.3	REINFEKTION.....	49
1.4.2.3.4	CMV-PNEUMONIE.....	49
1.4.2.3.5	CMV-INFEKTIONEN DES GASTROINTESTINALTRAKTES.....	51
1.4.2.3.5.1	CMV-KOLITIS.....	51
1.4.2.3.5.2	CMV-ÖSOPHAGITIS.....	51
1.4.2.3.5.3	CMV-GASTRITIS.....	52
1.4.2.3.6	CMV-HEPATITIS.....	52
1.4.2.3.7	CMV-RETINITIS.....	52
1.4.2.3.8	ATYPISCHE MANIFESTATIONEN EINER CMV-KRANKHEIT....	55
<b>1.4.3</b>	<b>PATHOGENESE.....</b>	<b>56</b>
<b>1.4.4</b>	<b>KLINISCHE RISIKOFAKTOREN.....</b>	<b>57</b>
1.4.4.1	HLA-DISPARITÄT.....	58
1.4.4.2	T-ZELL-DEPLETION.....	58
1.4.4.3	SEROSTATUS.....	59
1.4.4.4	GVHD.....	61
1.4.4.5	DOSISREDUZIERTE BEHANDLUNG.....	62
<b>1.4.5</b>	<b>DIAGNOSE.....</b>	<b>65</b>
1.4.5.1	FESTSTELLUNG DES INFEKTIONSSTATUS.....	65
1.4.5.2	NACHWEIS EINER PRIMÄRINFEKTION.....	65
1.4.5.3	NACHWEIS EINER REAKTIVIERUNG.....	66
1.4.5.4	VIRUS-ANTIGENNACHWEIS.....	67
1.4.5.4.1	KURZ-ZEIT-KULTUR.....	67
1.4.5.4.2	PP65-NACHWEIS.....	67
1.4.5.4.2.1	NACHWEIS MITTELS ANTIGENÄMIETEST.....	67
1.4.5.4.2.2	PP65-NACHWEIS MITTELS FACS-ANALYSE.....	68
1.4.5.5	VIRUS-GENOMNACHWEIS MITTELS PCR.....	69
1.4.5.5.1	GENAMPLIFIKATION.....	69
1.4.5.5.2	SIGNALAMPLIFIKATION.....	70
1.4.5.6	VIRUSANZUCHT IN ZELLKULTUREN.....	71
1.4.5.7	HISTOPATHOLOGISCHE NACHWEISE.....	71
1.4.5.8	DIAGNOSTIK-PROGRAMM.....	72
<b>1.4.6</b>	<b>PROPHYLAXE UND THERAPIE.....</b>	<b>73</b>



2.2.1.7.1.4.6	ABBLOCKEN POSITIVER LADUNGEN.....	100
2.2.1.7.1.4.7	HERSTELLUNG UND INKUBATION DER ANTIKÖRPERLÖSUNG.....	100
2.2.1.7.2	SEMIQUANTITATIVE AUSWERTUNG MITTELS EICKURVE.....	101
<b>2.2.2</b>	<b>GENETISCHE ANALYSE.....</b>	<b>104</b>
2.2.2.1	SNP-GENOTYPISIERUNG MITTELS PYROSEQUENZIERUNG.....	104
2.2.2.2	SNP-GENOTYPISIERUNG MITTELS REAL-TIME QUANTITATIVER RT-PCR TAQMAN-ASSAY™) .....	106
<b>2.2.3</b>	<b>STATISTISCHE ANALYSE.....</b>	<b>109</b>
2.2.3.1	FALL-KONTROLL-ASSOZIATIONSANALYSE.....	109
2.2.3.2	PRÜFUNG AUF HARDY-WEINBERG-GLEICHGEWICHT.....	110
2.2.3.3	DARSTELLUNG ANHAND DE-FINETTI-DIAGRAMME.....	111
2.2.3.4	DURCHFÜHRUNG COCHRAN-ARMITAGE-TREND-TEST.....	111
2.2.3.5	DURCHFÜHRUNG ALLELFREQUENZ-DIFFERENZ-TEST.....	112
2.2.3.6	ALLELIC ODDS RATIO.....	112
2.2.3.7	FISHER`S EXAKTER TEST.....	113
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>114</b>
<b>3.1</b>	<b>ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNG DER KLINISCHEN RISIKOFAKTOREN.....</b>	<b>114</b>
3.1.1	ERGEBNISSE ASPERGILLOSE.....	114
3.1.2	ERGEBNISSE CMV.....	115
<b>3.2</b>	<b>ASSOZIATIONSERGEBNISSE.....</b>	<b>116</b>
3.2.1	ERGEBNISSE ASPERGILLOSE.....	116
3.2.2	ERGEBNISSE CMV.....	120
	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>122</b>
	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>137</b>
	<b>ANHANG.....</b>	<b>139</b>
<b>1</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>139</b>
<b>2</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>166</b>

<b>3</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>170</b>
<b>4</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>171</b>
<b>5</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>172</b>
<b>6</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>173</b>

## **EINLEITUNG**

Zunehmende Informationen über das menschliche Genom und seine Variabilität haben ein neues Werkzeug zur Analyse der Genetik vieler Erkrankungen geliefert. Es ist bekannt, dass es im menschlichen Genom mehr als eine Million Single Nukleotid Polymorphismen (SNP) gibt, aber wahrscheinlich nur ein kleiner Bruchteil davon (1%) in funktionell relevanten Abschnitten liegt.<sup>1</sup> Zytokine (Interleukine, Interferone, Colony Stimulating Factors, Tumornekrosefaktoren) sind Schlüsselregulatoren der inflammatorischen und Immunantwort des Körpers. Alle diese Gene enthalten wahrscheinlich SNPs und bei mehreren von ihnen wurde nachgewiesen, dass sie die Funktion der Gene beeinflussen, z.B. die Quantität und Qualität, die von dem Protein produziert wird. Darüber hinaus gibt es unzählige Untersuchungen, die Assoziationen zwischen diesen SNP-Allelen mit der Prädisposition oder Schwere von Krankheiten inflammatorischer oder autoimmuner Natur belegen.<sup>2, 3</sup> Es sollte außerdem hervorgehoben werden, dass Zytokine in einer sehr komplexen netzwerkartigen Art und Weise funktionieren, die nicht zuverlässig in konventionellen In-vitro-Zellkultur-Methoden analysiert werden können. Daher ist eine beobachtete Assoziation eines gegebenen SNPs mit einer bestimmten Krankheit besonders bedeutsam, wenn eine wahre In-vivo-Signifikanz dieses Gens erwartet wird.

In dieser Arbeit wurde die Rolle von Zytokingenetik im Vergleich zum Einfluss bekannter klinischer Risikofaktoren bei Komplikationen nach Stammzelltransplantation, Aspergillose und CMV, untersucht.

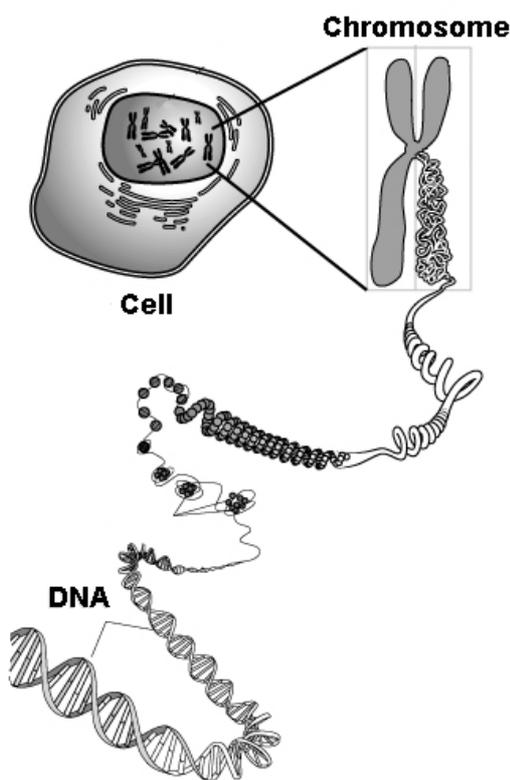
## **1 EINFÜHRUNG**

### **1.1.1 DEFINITION SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMEN (SNP)**

In nahezu jeder Zelle unseres Körpers liegt die gesamte Erbinformation in doppelter Ausführung in Form von zwei Chromosomensätzen vor, die jeweils von den beiden Eltern vererbt worden sind.

Die Chromosomensätze sind jedoch nicht vollkommen identisch, sondern unterscheiden sich im Schnitt alle 1000 Nukleotide (die Basen A, C, G, T) durch einen Basenaustausch.

Verschiedene Menschen haben unterschiedliche Basenpaare an bestimmten Lokalisationen im Genom.



**Abb. 1.**

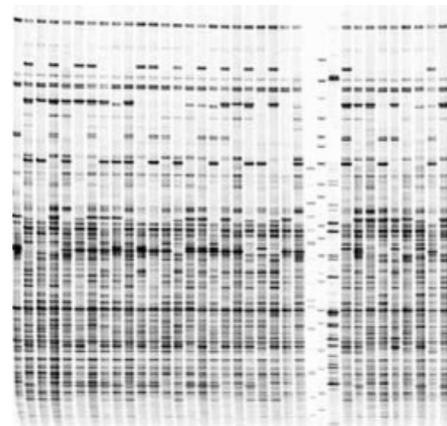
Das menschliche Genom

Zeigt der Unterschied eine Häufigkeit von mehr als einem Prozent in der Bevölkerung, spricht man von einem „Single Nucleotide Polymorphismus“ oder kurz SNP.

So reflektieren SNPs vergangene Mutationen, die meistens aber nicht ausnahmsweise einzigartige Ereignisse waren, und zwei Individuen, die ein variantes Allel teilen, sind dadurch mit einem gemeinsamen evolutionären Erbe markiert. In anderen Worten, unsere Gene haben Vorfahren und die Analyse gemeinsamer Schemata von SNP-Variationen kann sie identifizieren. <sup>4</sup>

**Abb. 2.**

Lokalisation von SNPs in menschlicher DNA



Die Mehrheit der SNPs hat keinen direkten physischen Einfluss auf die betroffenen Menschen, sie verändern nicht direkt die Proteinexpression oder sind für eine Krankheit verantwortlich. Dennoch können sie nahe bei einem Chromosom mit schädlichen Mutationen liegen. Aufgrund dieser örtlichen Nähe sind sie möglicherweise Gruppen von Menschen mit gesundheitsgefährdenden, aber

unbekannten Mutationen gemein und können als Marker dienen. Diese Marker helfen dabei, Mutationen zu erkennen und mögliche Therapien zu finden.<sup>5</sup>

Während im zwanzigsten Jahrhundert erst ein paar Tausend dieser SNPs identifiziert waren, hat sich bereits im ersten Jahr des neuen Jahrhunderts diese Zahl vertausendfacht. Neben der Anzahl dieser Veränderungen verfügt man heute außerdem über präzises Wissen über deren Lage im Genom. Die 1,42 Millionen bekannten SNPs werden in einer Dichte von einem SNP pro 1,91 Kilobasen gefunden. Das bedeutet, dass mehr als 90% jeder Sequenz, die 20 Kilobasen lang ist, ein oder mehr SNPs enthält. Noch höher ist die Dichte sogar in Regionen, die Gene enthalten. Die *International SNP Map Working Group*<sup>6</sup> schätzt, dass sie 60000 SNPs mit Genen („kodierende“ SNPs) identifiziert haben, oder einen kodierenden SNP pro 1,08 Kilobasen von Gensequenzen. Des Weiteren enthalten 93% der Gene einen SNP und 98% davon haben 5 Kilobasen SNPs. Zum ersten Mal ist fast jedes menschliche Gen und jede genomische Region mit einer Sequenzvariation markiert. Diese Daten bieten erste flüchtige Einblicke in das Variationsschema des Genoms. Variation wird gewöhnlich durch Nukleotiddiversität bestimmt – die Zahl der unterschiedlichen Basen zwischen zwei Genomen, die sich durch die Zahl der verglichenen Basenpaare unterscheiden.

Nukleotiddiversität ist ein sensibler Indikator für biologische und historische Faktoren, die das menschliche Genom beeinflusst haben.<sup>7</sup>

Die Nukleotiddiversität in Gen enthaltenden Regionen wurden auf acht Differenzen pro 10 Kilobasen geschätzt;<sup>8,9</sup> heute wissen wir, dass der genomweite Durchschnitt ähnlich ist, nämlich 7,51 Differenzen pro 10 Kilobasen. Die Variation zwischen individuellen Autosomen ist gering und liegt im Bereich 5,19 (für Chromosom 21) bis 8,79 (für Chromosom 15) Differenzen pro 10 Kilobasen.<sup>6</sup>

Auffällig ist, dass sich Menschen am wenigsten in ihren Gonosomen unterscheiden. Die Variation zwischen zwei verschiedenen X-Chromosomen liegt bei 4,69 Differenzen pro 10 Kilobasen, und es ist noch weniger beim Y-Chromosom (1,51 Differenzen pro 10 Kilobasen). Das liegt daran, dass die Gonosomen Mutations- und Rekombinationsschemata haben (der Austausch von ähnlichen DNA-Segmenten während der Bildung von Eiern und Spermien), die sich beide untereinander und von den Autosomen unterscheiden. Darüber hinaus haben weniger Vorfahren zu den Gonosomen beigetragen, weswegen sie weniger variabel als die Autosomen sind.

Vielleicht ist es nicht überraschend, dass manche Genomregionen eine signifikant höhere oder niedrigere Diversität zeigen als der Durchschnitt. Der HLA-Lokus z.B., der Proteine, die Antigene dem Immunsystem präsentieren, kodiert, zeigt die größte Diversität.

Nun soll die menschliche SNP-Karte dabei helfen, die Mitwirkung von individuellen Genen bei Krankheiten, die eine komplexe, multigene Basis haben, herauszufinden. Das Hauptaugenmerk der medizinischen Genetik liegt bei der Untersuchung von seltenen Genvarianten, die hinter Erbkrankheiten wie der Zystischen Fibrose liegen. Aber Genvarianten führen auch zu Gewebs- und Organinkompatibilität, was den Erfolg von Transplantationen beeinflusst.<sup>5</sup>

Der Nutzen der SNP-Karte ist, dass sie das gesamte Genom umfasst. So ist es möglich, durch Vergleich von Schemata und Häufigkeiten der SNPs zu identifizieren, welche SNPs mit welcher Krankheit assoziiert werden können.<sup>10-12</sup>

In Assoziationsstudien werden SNPs untersucht, um die „genetische Suszeptibilität“ eines Patienten, also die persönliche – genetisch konstituierte - Empfindsamkeit gegenüber Risikofaktoren und somit ein erhöhtes Krankheitsrisiko zu bestimmen.

## **1.1.2 AUSWAHL DER SNPS**

### **1.1.2.1 ALLGEMEINE KRITERIEN**

Die allgemeinen Kriterien, nach denen die SNPs ausgewählt werden sollten, sind in Tabelle 1 zusammengefasst:

Tab. 1.

Allgemeine Kriterien der SNP-Selektion <sup>13</sup>

Art der Variation	Lokalisation	Charakteristika	Häufigkeit	Phänotypischer Effekt
<b>Nonsense</b>	Kodierende Sequenz	Abbruch der Aminosäuresequenz	Sehr niedrig	Sehr stark
<b>Missense/nicht synonym</b>	Kodierende Sequenz	Änderung der Aminosäuresequenz mit möglicher Änderung der Proteineigenschaften	Niedrig	Mittelmäßig bis stark
<b>Insertion/Deletion</b>	Kodierende Sequenz	Änderung der Aminosäuresequenz mit möglicher Änderung der Proteineigenschaften	Niedrig	Niedrig bis sehr stark
<b>Synonym</b>	Kodierende Sequenz	Keine Änderung der Aminosäuresequenz/kann aber zu Splice-Varianten führen	Mittelmäßig	Niedrig bis stark
<b>Promoter/regulatorische Region</b>	Promoter, 5'UTR, 3'UTR	Keine Änderung der Aminosäuresequenz/kann aber die Genexpression beeinflussen	Niedrig bis mittelmäßig	Niedrig bis hoch
<b>Intron-Bereich</b>	Intron	Keine bekannte Funktion/kann aber die Genexpression oder die mRNA Stabilität beeinflussen	Hoch	Sehr schwach

### 1.1.2.2 BRADFORD-HILL-KRITERIEN

Darüber hinaus mussten bei der Assoziationsanalyse die Bradford-Hill-Kriterien <sup>14</sup> erfüllt werden. D.h. biologisch plausible Effekte sollten erkennbar sein, ein „dose-response-effect“ (1 vs. 2 mutierte Allele) sollte vorhanden sein, außerdem eine möglichst hohe Odds Ratio und eine Konsistenz mit anderen Studien.

### **1.1.2.3 VALIDIERUNG BY FREQUENCY**

Die Qualität einer Assoziationsanalyse lässt sich anhand der Größe der Stichprobe bestimmen. Bei großen Stichproben erzielen schon kleine Unterschiede signifikante p-Werte. Die SNPs mussten auf ihre klinische Relevanz hin überprüft sein, d.h. auf ihre sog. „Gültigkeit“. Häufigkeit und Signifikanz mussten durch eine ausreichend hohe Zahl klinischer Proben bestätigt sein. Ergänzende Informationen konnten in der SNP-Datenbank des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* gewonnen werden.

### **1.1.2.4 ALLELHÄUFIGKEIT**

Die Allelhäufigkeit musste mindestens 0,1 betragen, da ansonsten die Wahrscheinlichkeit für die Detektion eines SNP zu gering war.

### **1.1.2.5 LITERATUR**

Geeignete SNPs wurden mit Hilfe anderer Publikationen und elektronischen Datenbanken im Internet ausfindig gemacht. Hier fand man Gene mit den bisher bekannten Variationen veröffentlicht, darüber hinaus z. T. auch zusätzliche Informationen wie die Lokalisation und funktionelle Effekte. Manchmal erhielt man Auskunft über Allelfrequenzen, die in definierten Populationen ermittelt wurden.

### **1.1.2.6 AUSGEWÄHLTE SNPS**

Eine Übersicht über die ausgewählten SNPs bietet Tabelle 2.

Tab. 2.

Übersicht über die ausgewählten SNPs

SNP	Chromosom und Lokus	Lokalisation/ Funktion	Validiert by frequency	Allele	Allelhäufigkeit der Heterozygoten	Kodonposition	Codierte AS und evtl. Austausch	AS-Position
<b>CCL2</b>								
rs1024611*	17q11.2-q21.1	?	ja	G/A	0.346	-	-	-
rs4586*	17q11.2-q21.1	Exon	ja	C/T	0.500	3	Cystein [C]	35
rs13900*	17q11.2-q21.1	3' UTR	ja	G/A	0.298	-	-	-
<b>CCR1</b>								
rs1491955*	3p21	?	nein	C/T	0.006	-	-	-
rs3136666*	3p21	?	nein	C/T	?	-	-	-
rs3136665*	3p21	?	ja	C/T	0.117	-	-	-
rs3136664*	3p21	Exon	ja	A/G	0.076	3	Leucin [L]	127
rs3136663*	3p21	Intron	ja	A/G	0.265	-	-	-
rs3176826*	3p21	Intron	ja	C/T	0.081	-	-	-
rs3176825*	3p21	Intron	ja	A/C	0.066	-	-	-
rs1491961*	3p21	?	ja	C/T	0.215	?	?	?
<b>CCR5</b>								
rs1799988*	3p21	5' UTR	ja	C/T	0.497	-	-	-
rs1800023*	3p21	5' UTR	nein	A/G	-	-	-	-
rs17141079*	3p21	?	ja	A/T	0.385	-	-	-
rs2734648*	3p21	Intron	ja	G/T	0.465	-	-	-
rs746492*	3p21	3' UTR	ja	A/C	0.756	-	-	-
<b>CCR6</b>								
rs1331299*	6q27	?	ja	C/T	0.466	?	?	?
rs1855025*	6q27	Intron	ja	C/T	0.473	-	-	-
rs3093016*	6q27	Intron	ja	C/T	0.157	-	-	-
rs3093015*	6q27	Intron	ja	C/G	0.420	-	-	-
rs3093010*	6q27	Intron	ja	A/C	0.341	-	-	-

rs3093009*	6q27	Intron	ja	A/G	0.405	-	-	-
rs3093007*	6q27	Exon	ja	C/T	0.242	3	Phe [F]	19
rs2071171*	6q27	Exon	ja	C/T	0.496	3	Thr [T]	108
rs3093004*	6q27	3' near gene	ja	A/G	0.041	-	-	-
<b>CCR7</b>								
rs2229095*	17q12-q21.2	Exon	ja	A/G	?	3	Gln [Q]	303
rs2023906*	17q12-q21.2	Intron	ja	A/G	0.204	-	-	-
rs3136689*	17q12-q21.2	Intron	ja	C/T	0.109	-	-	-
rs3136687*	17q12-q21.2	Intron	ja	A/G	0.380	-	-	-
rs3136686*	17q12-q21.2	Intron	ja	A/T	0.228	-	-	-
rs3136685*	17q12-q21.2	Intron	ja	A/G	0.437	-	-	-
<b>CLEC7A</b>								
rs2078178 <sup>A</sup>	12p13.2	Intron	ja	C/T	0.442	-	-	-
<b>CXCL10</b>								
rs1554013*	4q21	?	ja	C/T	0.428	?	?	?
rs3921*	4q21	3' UTR	ja	C/G	0.433	-	-	-
rs4859588*	4q21	Intron	ja	A/G	0.432	-	-	-
rs4257674*	4q21	?	ja	A/G	0.398	?	?	?
<b>ICAM1</b>								
rs5491 <sup>A</sup>	19p13.3-p13.2	Exon		A/T		2	Met [M] A Lys [K]	56
rs281432 <sup>A</sup>	19p13.3-p13.2	Intron	ja	C/G	0.500	-	-	-
<b>IFNG</b>								
rs2069727*	21q14	3' near gene	ja	A/G	0.386	-	-	-
rs2069718*	21q14	Intron	ja	C/T	0.458	-	-	-
rs2069714*	21q14	Intron	ja	A/C	0.050	-	-	-
rs1861493*	21q14	Intron	ja	A/G	0.395	-	-	-
rs1861494*	21q14	Intron	ja	C/T	0.407	-	-	-
rs2069711*	21q14	Intron	nein	G/T	0.005	-	-	-
rs2069705*	21q14	?	ja	C/T	0.495	-	-	-
<b>IL4</b>								
rs2070874 <sup>C</sup>	5q31.1	5' UTR	ja	C/T	0.498	-	-	-

rs734244 <sup>C</sup>	5q31.1	Intron	ja	A/G	0.497	-	-	-
rs2227284 <sup>C</sup>	5q31.1	Intron	ja	A/C	0.418	-	-	-
<b>IL6</b>								
rs1554606 <sup>*</sup>	7p21	Intron	ja	G/T	0.401	-	-	-
rs2069845 <sup>*</sup>	7p21	Intron	ja	A/G	0.395	-	-	-
<b>IL10</b>								
rs3024492 <sup>*</sup>	1q31-q32					-	-	-
		Intron	ja	A/T	0.237			
rs1800871 <sup>*</sup>	1q31-q32	?	ja	C/T	0.490	-	-	-
rs1800896 <sup>*</sup>	1q31-q32	?	ja	A/G	0.417	-	-	-
rs1878672 <sup>*</sup>	1q31-q32	Intron	ja	C/G	0.389	-	-	-
rs1518111 <sup>*</sup>	1q31-q32	Intron	ja	A/G	0.499	-	-	-
rs1800893 <sup>C</sup>	1q31-q32	Intron	ja	A/G	0.424	-	-	-
rs1554286 <sup>C</sup>	1q31-q32	Intron	ja	C/T	0.499	-	-	-
<b>IL12B</b>								
rs1368439 <sup>*</sup>	5q31.1-q33.1	3' UTR	ja	G/T	0.133	-	-	-
rs2569253 <sup>*</sup>	5q31.1-q33.1	Intron	ja	C/T	?	-	-	-
rs3181217 <sup>*</sup>	5q31.1-q33.1	Intron	ja	A/G	0.435	-	-	-
rs2195940 <sup>*</sup>	5q31.1-q33.1	Intron	ja	C/T	0.196	-	-	-
rs3213097 <sup>*</sup>	5q31.1-q33.1	Intron	ja	A/T	0.467	-	-	-
<b>IL18</b>								
rs3882891 <sup>*</sup>	11q22.2-q22.3	Intron	ja	A/C	0.500	-	-	-
rs4937113 <sup>*</sup>	11q22.2-q22.3	Intron	ja	A/T	?	-	-	-
rs2043055 <sup>*</sup>	11q22.2-q22.3	Intron	ja	A/G	?	-	-	-
rs1834481 <sup>*</sup>	11q22.2-q22.3	Intron	ja	C/G	0.163	-	-	-
<b>SCYA20</b>								
rs2396506 <sup>*</sup>	2q33-q37	Intron	ja	A/G	0.131	-	-	-
rs2396507 <sup>*</sup>	2q33-q37	Intron	ja	C/T	0.143	-	-	-
rs3138114 <sup>*</sup>	2q33-q37	Intron	ja	C/G	0.168	-	-	-
rs3176897 <sup>*</sup>	2q33-q37	Intron	ja	A/G	0.180	-	-	-
rs2174626 <sup>*</sup>	2q33-q37	Intron	ja	G/T	0.168	-	-	-
rs2135483 <sup>*</sup>	2q33-q37	Intron	ja	C/T	0.168	-	-	-
rs940339 <sup>*</sup>	2q33-q37	?	ja	A/G	0.413	?	?	?

<b>TLR2</b>									
rs1898830*	4q32	Intron	ja	A/G	0.416	-	-	-	-
rs3804099*	4q32	Exon	ja	C/T	?	3	Asn [N]	199	
rs3804100*	4q32	Exon	ja	C/T	0.239	3	Ser [S]	450	
<b>TLR4</b>									
rs1927911*	9q32-q33	Intron	ja	C/T	0.479	-	-	-	-
rs4986790*	9q32-q33	Exon	ja	A/G	0.086	2	Gly [G] Asp [D]	299	
rs2737191*	9q32-q33	?	ja	A/G	0.233	?	?	?	
rs5030728*	9q32-q33	Intron	ja	A/G	0.302	-	-	-	-
rs1554973*	9q32-q33	?	ja	C/T	?	?	?	?	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>									
rs1800629*	6p21.3	5' near gene	ja	A/G	0.161	-	-	-	-
rs2228088*	6p21.3	Exon	ja	G/T	0.046	3	Arg [R]	29	
rs3093663*	6p21.3	Intron	?	C/T	0.022	-	-	-	-
rs3093664*	6p21.3	Intron	ja	A/G	0.160	-	-	-	-
rs3093665*	6p21.3	3' UTR	ja	A/C	0.105	-	-	-	-

\* Marker untersucht für CMV und Aspergillose

C Marker untersucht für CMV

A Marker untersucht für Aspergillose

? keine Daten vorhanden

## **1.2 INFEKTIÖSE KOMPLIKATIONEN NACH STAMMZELLTRANSPLANTATION**

### **1.2.1 FRÜHE POSTTRANSPLANTATIONSPHASE (PRE-ENGRAFTMENT)**

Fieberepisoden in der frühen Phase nach Stammzelltransplantation sind in der großen Mehrheit durch Infektionen verursacht. Nach abgeschlossenem Konditionierungsregime entwickeln fast alle Patienten eine schwere Neutropenie und neutropenisches Fieber als ein frühes klinisches Zeichen einer Infektion.<sup>15, 16</sup> Allerdings können die Infektzeichen durch eine schwere Neutropenie verdeckt werden. Angeblich sind 20% der febrilen Patienten mit schwerer Neutropenie ( $<0.5 \times 10^9/L$ ) bakteriämisch, aber die initiale Phase der Infektion ist durch eine Fehlen einer Entzündungsantwort nicht ersichtlich.<sup>17</sup> Daher kann die Infektionsquelle in der Klinik nur selten oder nur mit Hilfe bildgebender Verfahren bestimmt werden.<sup>15</sup> Meistens sind die Entzündungsherde im Verdauungstrakt, in den Lungen oder an der Haut, wo invasive Eingriffe Pathogenen Eintritt verschaffen.<sup>17, 18, 19</sup>

Das Risiko, in der frühen Posttransplantationsphase eine Infektion zu entwickeln, wird hauptsächlich durch die Dauer und Schwere der Neutropenie bestimmt.<sup>15</sup> Die Relation zwischen der Zahl der Neutrophilen und dem Risiko einer Infektion ist schon seit mehr als 30 Jahren bekannt.<sup>20</sup>

Einer der Hauptursachen von Morbidität und Tod im frühen Stadium nach Transplantation sind nosokomiale Infektionen.<sup>17, 22</sup> Daher gehören zu modernen Transplantationseinheiten eine „sterile“ Laminar-Flow-Umgebung, einer antimikrobiologische Dekontaminierung des Gastrointestinaltraktes, die Gabe „sterilen“ Essens, spezielle Gerätschaften zum Patientenmonitoring und geschultes Fachpersonal.

Andere Risikofaktoren für infektiöse Komplikationen sind extensive Schädigung der Mukosa durch die Konditionierungsbehandlung, bakterielle Kolonisierung, lokale fungale und virale Infektionen, Reaktivierung von Infektionen, die in früheren Neutropeniephasen erlangt wurden, und schließlich der Gebrauch von Zentralen Venenkathetern (ZVK). Die Zahl der Spender-Stammzellen und die Art der GvHD-Prophylaxe sind Faktoren, die die Rate der hämatopoetischen Rekonstitution bestimmen und können daher die Insidenz und Schwere von Infektionen in der frühen Posttransplantationsphase ebenso beeinflussen. Bakterielle und fungale

Infektionen nach allogener Stammzelltransplantationen in der Neutropeniephase schlagen oft eine lebensbedrohliche Richtung ein.

Bakterielle Pathogene sind für etwa 90% der Infektionen in dieser Phase verantwortlich. Bakteriämien sind bei 16-31% der Patienten nach allogener Stammzelltransplantation dokumentiert, die Mehrheit (65-75%) davon ist durch grampositive Pathogene verursacht. Infektionen, die durch gramnegative Bakterien ausgelöst werden, sind weitaus seltener. Dennoch zeichnen sie sich durch eine größere Morbidität und Mortalität aus.

Die häufigsten grampositiven Pathogene sind koagulase-negativen Staphylokokken<sup>15, 21</sup>, Korynebakterien und alphahämolytische Streptokokken. Grampositive Infektionen werden hauptsächlich mit ZVK assoziiert<sup>15, 21, 23</sup> und noch häufiger mit Patienten mit schwerer Mukositis.<sup>15</sup> Zum Teil werden Bakteriämien mit *viridans streptococci* so wie *Streptococcus mitis* mit einem toxischen Schocksyndrom oder ARDS in 10% der betroffenen Patienten assoziiert, welche eine große Mortalität zur Folge haben.

Im Gegensatz dazu wird angenommen, dass die gramnegativen Pathogene über verletzte Mukosa des Gastrointestinaltrakts bei Patienten mit schwerer gastrointestinalen Mukosaschädigung in den Blutstrom gelangen.<sup>15, 19</sup>

Klinische Zeichen und Symptome eines akuten Abdomens sind bei bis zu 5% aller Krebspatienten, die eine zytostatische Therapie erhalten, zu beobachten.<sup>24</sup> Pathogene sind allerdings nur bei einem Drittel dieser Patienten zu diagnostizieren.<sup>19</sup>: Gramnegative Aerobier (z.B. *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*) und Anaerobier (z.B. *Clostridium*-Spezies), selten *Candida*-Spezies, *Herpes simplex* oder *Cytomegalovirus*<sup>19</sup>. Die Kolonisierung des Verdauungstraktes mit *Pseudomonas aeruginosa* soll prädiktiv sein für ein späteres Auftreten einer *P. aeruginosa*-Bakteriämie.<sup>21, 25</sup> Die kleine Zahl der Patienten, die eine *P. aeruginosa*-Bakteriämie entwickeln, mag darin begründet sein, dass inzwischen eine Anti-*Pseudomonas*-Therapie eingeleitet wird, wenn eine Besiedelung bekannt ist.<sup>21</sup>

Die häufigste gastrointestinale Infektion (bis zu 50%) in der Neutropenie ist die neutropenische Enterkolitis.<sup>26</sup> Klinisch imponiert diese als ein schmerzhaftes Abdomen mit Übelkeit, Subileus oder Ileus<sup>19</sup>.

Seit dem ausgedehnten Einsatz von effektiven empirischen Antibiotika gab es eine Verschiebung von infektiösen Erregern von hoch letalen, gramnegativen Bakterien

zu indolenteren, grampositiven bakteriellen und fungalen Pathogenen.<sup>19, 27, 28, 29</sup> Cephalosporine der 3. Generation und Fluoroquinolone sind nämlich wirksamer gegen gramnegative als gegen grampositive Bakterien. Es wurde nachgewiesen, dass der Gebrauch von Fluoroquinolonen einer der Faktoren war, der signifikant mit der Entwicklung von Streptokokken-Bakteriämien assoziiert werden konnte. Besonders, wenn sie in Kombination mit H<sub>2</sub>-Blockern und anderen Antazida gegeben wurden, was wahrscheinlich auf eine vermehrte Kolonisierung der gastrischen und ösophagealen Flora durch orale Streptokokken zurückzuführen ist.<sup>19, 29, 30</sup>

Die Veränderung der epidemiologischen Situation von der prädominanten Rolle der gramnegativen Bakterien in den 1970ern zu der prädominanten Rolle der grampositiven Bakterien ab Mitte der 1980er<sup>29</sup> kann darüber hinaus vielleicht damit erklärt werden, dass die Behandlung von Krebs intensiver wurde, die Neutropeniephasen sich verlängerten und orale Mukositis und Diarrhö häufiger auftraten, was zu einem größeren Defekt der Mukosabarrieren und einem steigenden Risiko für Infektionen mit residenter grampositiver oraler Flora führte. Außerdem wurden die Krebspatienten häufiger mit Verweilkathetern (besonders *Broviac* oder *Hickman* und *Port-a-Cath*) versehen, was die steigende Zahl von Infektionen mit Staphylokokken-Infektionen erklären könnte.<sup>19, 30</sup>

Virale Infektionen treten ebenfalls häufig in der frühen Posttransplantationsphase auf. Bei seropositiven Patienten ohne adäquate antivirale Prophylaxe können bei über 70% HSV-Infektionen dokumentiert werden. Da aber in fast allen Kliniken routinemäßig eine Aciclovir-Prophylaxe bei allen Patienten durchgeführt wird, treten disseminierte HSV-Infektionen selten auf. In den letzten Jahren wurde eine Zunahme von Infektionen des Respirationstrakts wie z.B. durch den Respiratory Syncytial Virus (RSV), den Parainfluenza-Virus, den Adeno-Virus und den Rhinovirus festgestellt. Nach einer initialen Infektion des Respirationstraktes können diese Viren nachfolgend zu einer interstitiellen Pneumonie führen, die zu einer substantiellen Mortalität führt.<sup>15</sup>

Respiratorische Virusinfektionen wie der RSV und Influenza A und B sind ein wichtiger Grund für ambulant erworbene Lungenerkrankungen bei immunsupprimierten Krebspatienten.

Eine respiratorische Virusinfektion besteht, wenn zwei oder mehr respiratorische Symptome vorhanden sind. Dazu zählt man Rhinorrhö oder Niesen, nasale

Kongestion, Pharyngitis, leichte zervikale Adenopathie, Husten, Dyspnoe oder Brustschmerzen, die mehr als zwei Tage anhalten. (Mehr als zwei Tage, um auszuschließen, dass eine Allergie zu Grunde liegt.)

Eine respiratorische Virusinfektion liegt per definitionem auch vor, wenn pulmonale Infiltrate gefunden werden können.<sup>31</sup>

In einer Studie von *Roghamann et al* zeigten 56% der Patienten nach Stammzelltransplantation respiratorische Symptome.<sup>31</sup>

Ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer Aspergillose könnte mit direkten Effekten auf die pulmonäre Phagozytenfunktion begründet sein. Eine frühere Studie belegt, dass respiratorische Viren die mikrobizide Aktivität der murinen Alveolarmakrophagen vermindern.<sup>32</sup>

Auf die Pilzinfektionen, insbesondere Aspergillose, wird nachfolgend aber noch gesondert eingegangen werden. Vorab kann aber gesagt werden, dass bei autologen Transplantationen Aspergillose früher auftritt als bei allogenen Transplantationen. Diese bimodale Verteilung der Aspergillose wurde bei verschiedenen Studien festgestellt.<sup>21, 33, 34</sup>

Die wenigen nicht auf Infektionen zurückführbaren Gründe von neutropenischem Fieber in der frühen Posttransplantationsphase sind die Transfusion von Blutprodukten, die Applikation von Immunglobulinen, medikamenteninduziertes Fieber (z.B. durch Cytosinarabinoside, Amphotericin B, Bleomycin, G-CSF), Allergien und eine akute GvHD-Reaktion.

### **1.2.2 INTERMEDIÄRE POSTTRANSPLANTATIONSPHASE (VON DER HÄMATOPOETISCHEN REKONSTITUTION BIS TAG +100 NACH TRANSPLANTATION)**

Nach dem Engraftment besteht ein kombiniertes quantitatives und funktionelles Defizit der T- und B-Lymphozyten trotz vollständiger hämatopoetischer Rekonstitution. Falls T-Zell-Depletion stattgefunden hat oder eine Inkompatibilität der Major-Histocompatibility-Antigene zwischen Empfänger und Spender in Kauf genommen werden musste, sind diese Immundefizienzen prominent für prolongierte Perioden nach Transplantation. Diese Defizienzen manifestieren sich als

Funktionsstörung der T-Helfer-Zellen und Fehlsteuerung der Immunglobulinsynthese, aber auch als beeinträchtigte zytotoxische T-Zell-Antwort. Obwohl sich die Zellzahl normalisiert, persistiert die Beeinträchtigung der Granulozytenfunktionen, z. B. die Einschränkung der Chemotaxis und Phagozytose.

Bei 74% der Patienten nach allogener Stammzelltransplantationen treten nach Tag +50 Infektionen auf. In der Mehrheit der Patienten werden diese Infektionen durch Viren wie CMV oder andere virale Infektionen wie HHV6, RSV, Adenovirus, VZV und EBV getriggert.<sup>15</sup>

Adenoviren, die bei Gesunden milde oder subklinische akute oder subklinische Infektionen verursachen, können so bei Immunkompromittierten mit einem Mangel an Adenovirusspezifischen T-Helferzellen schwere oder sogar fatale Folgen haben.<sup>35</sup>

Die Rekonstitution einer EBV-gerichteten T-Zell-Antwort ist beispielsweise essentiell, um die Proliferation von EBV-transformierten B-Zellen zu kontrollieren.<sup>35</sup>

Die Rolle der T-Zellen in der Abwehr fungaler Infektionen wird im Kapitel 1.3 *Aspergillose* näher erläutert werden.

### **1.2.3 SPÄTE POSTTRANSPLANTATIONSPHASE (AB TAG +100 NACH TRANSPLANTATION)**

Nach Tag+100 nach Transplantation treten Infektionen relativ selten auf. Ein signifikant höheres Risiko haben Patienten mit einem hämatologischen Malignom oder dokumentierten frühen Infektionen (v.a. Pneumonie, Bakteriämie oder Clostridium-difficile-Kolitis). Meistens handelt es sich bei den Infektionen in der späten Posttransplantationsphase um leichtere Infektionen, nämlich banale obere Atemwegsinfektionen. Aber auch Zoster-Infektionen.<sup>36</sup>

---

## **1.3 ASPERGILLOSE**

### **1.3.1 EPIDEMIOLOGIE**

#### **1.3.1.1 INZIDENZ**

Die Inzidenzrate nach Stammzelltransplantation kann 10-15% oder mehr betragen und scheint sogar zuzunehmen, wie eine Studie aus Seattle<sup>37</sup> zeigt. Von 5589 HSCT Empfängern, die dort zwischen 1985 und 1999 transplantiert wurden, stieg die Inzidenz einer invasiven Aspergillose (IA) innerhalb des ersten Jahres nach HSCT von 5% vor 1990 auf 12% seit 1998 an.<sup>38</sup>

Eine Reihe von Entwicklungen unterstützte diesen Trend. Erstens, erfolgreiche antibakterielle Chemotherapie reduzierte die Morbidität und Mortalität durch bakterielle Infektionen während der Neutropeniephase, was aber das Risiko einer fungalen Kolonisierung erhöhte. Zweitens, Intensivierung der Chemotherapie resultierte in verlängerten Neutropeniephasen und der extensiveren Durchbrechung von Mukosabarrieren, besonders bei Leukämiepatienten.<sup>39</sup>

Außerdem erhalten eine steigende Anzahl von Patienten Cytosinarabinside, was zu sich wiederholenden Perioden von Neutropeniephasen mit >30 Tagen führt; dieses erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass die Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation bereits vorangegangene invasive Pilzinfektionen aufweisen.

#### **1.3.1.2 LETALITÄT**

Invasive Aspergillosen bei Patienten mit hämatologischen Krankheiten stellen eine beachtenswerte therapeutische Herausforderung dar, die Mortalitätsrate liegt 3 Monate nach Diagnose bei 40%.<sup>39</sup>

Wenn die IA während der durch Chemotherapie induzierten Neutropenie auftritt, liegt die Mortalitätsrate bei annähernd 60% und kann sich auf 90% während der Einstellung der SCT ausdehnen.<sup>40</sup> Eine Verbesserung der Überlebensrate kann durch Früherkennung und prompte Initiation einer antifungalen Therapie erreicht werden.<sup>41-43</sup>

## 1.3.2 ÄTIOLOGIE

### 1.3.2.1 ERREGER UND INFEKTIONSQUELLEN



**Abb. 3.**

*Aspergillus fumigatus*

30–40% der gesicherten Pilzinfektionen nach Stammzelltransplantation fallen auf *Aspergillus* spp.<sup>8</sup>

<sup>11</sup> *Aspergillus fumigatus* stellt den bekanntesten Erregerorganismus dar, aber es wird auch von

*Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* und *Aspergillus nidulans* berichtet.<sup>44</sup>

*Aspergillus* spp sind Schimmelpilze mit septierten Hyphen von ca. 2 - 4 µm, die ubiquitär vorkommen und auf abgestorbenen Blättern, in Getreidelagern oder Komposthaufen, in Heustöcken, auf zerfallenden Pflanzen, aber auch in Nahrungsmitteln wie Tee und Nüssen zu finden sind. Das makroskopische Erscheinungsbild der *Aspergillus*-Kolonien kann zur Speziesidentifikation verwandt werden. Die Infektion mit *Aspergillus* erfolgt meist exogen über die Atemluft. Aufgrund ihrer geringen Größe können die Sporen bis in die Lungenalveolen vordringen. Bei liegenden zentralvenösen Kathetern oder nach chirurgischen Eingriffen treten allerdings auch invasive Infektionen an anderen inneren und äußeren Körperstellen auf. Die Inkubationszeit ist unterschiedlich. Nosokomiale invasive Aspergillosen werden mit erhöhter Sporenbelastung in der Umgebung in Zusammenhang gebracht. In der Klinik kommen *Aspergillus*-Sporen gehäuft in ungefilterter Luft, Belüftungssystemen, Nahrungsmitteln (z.B. Pfeffer, Gewürze), Teppichen und Topfpflanzen sowie während Bauarbeiten vor.<sup>45, 46</sup>

### 1.3.2.2 PATIENTENGRUPPEN

Die Aspergillose ist eine opportunistische Infektionskrankheit, d.h. es sind unterschiedliche Patientengruppen zu finden. Die Höhe des Risikos einer Erkrankung

ist sehr stark von der Immunkompetenz des Patienten abhängig. So ist die starke Korrelation zwischen Neutropenie und Aspergillose für die Festlegung von Risikogruppen sehr bedeutsam.<sup>47</sup>

Latgé<sup>49</sup> hielt fest, dass Patienten mit einer Neutropenie  $<500/\text{mm}^3$  bzw.  $<100/\text{mm}^3$ , die länger als zwölf Tage andauert, das größte Risiko tragen, an einer invasiven Aspergillose zu erkranken. Das sind folgende Patientengruppen:

- Allogene Knochenmarktransplantatempfänger mit langer Neutropenie oder Kortikoidsteroidbehandlung wegen einer Abstoßungsreaktion (GvHD)
- Autologe Knochenmarktransplantatempfänger oder andere Organtransplantierte mit einer Neutropenie  $> 2$  Wochen
- Patienten mit akuter Leukämie oder Lymphomen unter Chemotherapie
- Patienten mit aplastischen Anämien und langen Neutropenien
- Patienten mit vorhergehender invasiver Aspergillose im Hinblick auf eine neuerliche Chemotherapie bzw. Knochenmarkstransplantation
- Patienten mit fortgeschrittener HIV-Infektion

Wie an anderer Stelle bereits erwähnt, besteht bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation eine deutliche Korrelation zwischen Schwere und Dauer der Neutropenie und der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Infektionen durch Bakterien, Viren und Pilze. Bei Patienten nach einer soliden Organtransplantation hängt das Auftreten invasiver Pilzinfektionen vom jeweiligen Organ ab. Lungen- und Lebertransplantierte sind so z.B. gefährdeter. Bei Lungentransplantierten ist eine Cytomegalievirus-Infektion ein zusätzlicher Risikofaktor. Eine weitere Rolle spielen die eingeschränkte natürliche Abwehr und der Einsatz immunsuppressiver Medikamente. Die Phase, in der auch eine GvHD auftreten könnte, ist auch besonders sensibel für die Infektion mit *Aspergillus*.

### Tab. 3.

Übersicht Risikogruppen<sup>48</sup>

---

#### Hohes Risiko $>10\%$

- Allogene KMT (GvHD  $>$  Grad II)
  - AML (ungeschützte Umgebung)
  - Lungenentzündung
  - Chronisch granulomatöse Entzündung
-

---

**Moderates Risiko 1-10%**

- AIDS
- Leber-, Herz-, Pankreastransplantation
- AML (geschützte Umgebung)
- Allogene KMT (ohne GvHD oder Grad I)
- Autologe KMT
- Intensivpflege ohne Steroide
- Schweres kombiniertes Immunmangelsyndrom
- Lymphom
- Schwere Verbrennung (> 30 %)

---

**Niedriges Risiko <1%**

- Systemischer Lupus erythematodes (mit Prednisolon)
- Diabetes mellitus
- Alkoholismus
- Kortikosteroidbehandlung
- Behandlung solider Tumore
- Intensivpflege
- Agammaglobulinämie
- Nierentransplantation
- Malaria
- Grippe
- Chirurgie in kontaminierter Raumluft
- Schweres Trauma

---

**Vernachlässigbares Risiko**

- Gesundheit
- Hospitalisierung ohne Neutropenie oder Kortikosteroidbehandlung oder andere Risikobedingungen

---

Weitere Risikogruppen sind Patienten mit unterschiedlich veränderter Immunantwort wie z.B. Frühgeborene, Diabetiker, Patienten mit granulomatösen oder rheumatischen Erkrankungen, allen voran jene, die hohe Dosen an intravenösen immunsuppressiven Wirkstoffen erhalten.<sup>1013</sup> Ebenso Patienten nach schweren Unfällen und Verbrennungen. Kortikosteroidbehandlungen, immunsuppressive Therapien und immunmodellierende Virusinfektionen (z.B. CMV) sind weitere prädisponierende Faktoren.<sup>49, 51</sup>

### 1.3.2.3 KRANKHEITSBILDER

Die Einteilung in verschiedene Krankheitsbilder erfolgt nach Infektionsort, Ausmaß und Art des Pilzwachstums. All diese Faktoren stehen in Abhängigkeit vom Immunstatus des Patienten.

Die Sinusitis, Asthma und Alveolitis, also allergische Erkrankungen, treten bei gehäufter Exposition gegenüber Pilzsporen auf und können durch Vermeidung der Sporen gelindert werden. Anders ist es bei invasiver Aspergillose, ABPA (allergischer bronchopulmonaler Aspergillose) und Aspergillom, hier kommt es zu einem Pilzwachstum im Körper. In den meisten Fällen handelt es sich um eine pulmonale invasive Aspergillose. Bei wenig immunkomprimierten Patienten wie beispielsweise Diabetikern kommt es zu langsamen Verläufen, wohingegen es bei stark immunsupprimierten Patienten nach Auftreten der klinischen Symptome nur 7-14 Tage dauern kann bis zum Tod.<sup>45, 49</sup>

#### 1.3.2.3.1 INVASIVE ASPERGILLOSE

Einteilung nach *Latgé*<sup>49</sup>:

- Akute oder chronische invasive Aspergillose
- Tracheobronchitis und obstruktive Bronchitis
- Akute invasive Rhinosinusitis
- Dissemination (z.B. Gehirn, Niere, Herz, Haut, Auge)

Schlüsselrisikofaktoren für das Auftreten einer invasiven Aspergillose sind quantitative und funktionelle Defekte der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten.<sup>52</sup>

Frühe klinische Symptome der *akuten pulmonalen invasiven Aspergillose* sind Fieber, Husten und Atemnot. Hämoptysen können evtl. durch invasives Wachstum in Blutgefäße entstehen. Die Prognose einer lokalen Erkrankung ist allerdings besser als die einer diffusen.

Bei Knochenmarkstransplantierten haben invasive Aspergillosen zwei Risikoperioden. Die erste in der initialen, langanhaltenden Neutropenie und später bei einer evtl. GvHD oder Cytomegalovirusinfektion.<sup>53</sup>

Der Wiederanstieg der Zahl der neutrophilen Granulozyten ist für den Verlauf der Erkrankung von größter Bedeutung.<sup>54</sup>

Die selten auftretende *chronische invasive Aspergillose* ist bei AIDS-Patienten, Diabetikern, Alkoholikern und Patienten unter Kortikosteroidbehandlung zu finden.

Die Tracheobronchitis tritt vornehmlich bei AIDS-Patienten und Lungentransplantierten auf. Als Komplikation sind Verschluss der Atemwege, Dissemination und Perforation der Trachea bekannt. Die Diagnose erfolgt mittels Bronchioskopie (Biopsie, Mikroskopie, Kultur).

Die *invasive Aspergillus-Sinusitis* zeigt klinisch Fieber, Kopfschmerzen, Husten und Nasenbluten. Normalerweise ist sie der einzige Infektionsort, es kann aber auch zu lokaler Ausbreitung kommen. Man unterscheidet eine klinische und eine chronische Form. Die chronische Form ist aber meist nicht durch immunkompromittierende Faktoren bedingt, so kann sie beispielsweise nach kieferchirurgischen Eingriffen auftreten.<sup>55</sup>

*Kutane Aspergillosen* sind meist an Einstichstellen von zentralen Venenkathetern bei neutropenischen Patienten zu finden. Des Weiteren gibt es Pilzdermatiden bei Frühgeborenen, Kindern mit AIDS und Patienten mit Verbrennungen, die auf *Aspergillus fumigatus* zurückzuführen sind.<sup>56</sup>

Zu einer Manifestation einer *zerebralen Aspergillose* kann es im Rahmen einer Dissemination kommen. Ihre Letalität liegt bei 95%.<sup>45</sup>

Eine Aspergillose kann auch nach Monaten erneut auftreten, weswegen sich eine Sekundärprophylaxe empfiehlt. Besonders sensibel sind Patienten mit vielen Chemotherapiezyklen, hier ist das Risiko 30%, die Letalitätsrate 80%.<sup>57</sup>

#### Tab. 4.

Faktoren, die zu einem schlechten Therapieansprechen führen<sup>58</sup>

- 
- Leukämierückfall
  - Fortbestehende Neutropenie
  - Keine Reduktion der Immunsuppression
  - Diffuse pulmonale Aspergillose
  - Hämoptysen
  - Verzögerter Therapiebeginn
  - Niedrige Dosierung von Amphotericin B während einer Neutropenie

- Niedrige Itrakonazolspiegel
  - Keine sekundäre Prophylaxe bei neuerlicher Neutropenie
  - Histologisch verifizierte Gefäßinvasion
- 

### **1.3.2.3.2 ALLERGISCH BRONCHOPULMONALE ASPERGILLOSE**

Die ABPA imponiert klinisch als Bronchialasthma mit vorübergehenden Lungeninfiltraten. Prädisponiert sind Patienten mit atopischem Asthma oder zystischer Fibrose. Die Diagnosestellung gestaltet sich schwierig. Die Therapie erfolgt mittels Kortison. Unbehandelte Patienten können eine Lungenfibrose ausbilden.<sup>49</sup>

### **1.3.2.3.3 ASPERGILLOM**

Das *Aspergillom* war früher die klassische Form der Aspergillose. Die Tuberkulose beispielsweise schafft Hohlräume in den Lungen, in die der Aspergillus-Pilz dann nicht invasiv einwachsen kann. Hämoptysen können Symptome sein, die Diagnose erfolgt radiologisch.

Aspergillom und ABPA treten bei immunkompetenten Patienten auf.<sup>49, 59</sup>

## **1.3.3 PATHOGENESE**

Die infektiösen Sporen des Aspergillus-Pilzes sind die Konidien mit einem Durchmesser von 1-3 µm, die von der Luft weiter getragen werden.<sup>60</sup> Da sie so klein sind, entkommen sie der Abwehr des oberen Respirationstraktes und gelangen bis in die distalen Alveolarräume. Dort keimen sie zu angioinvasiven Filamenthyphen, die lokal gewebsschädigend sind und zu Hämorrhagien, Infarkten und koagulierenden Nekrosen führen. Im Gewebe erscheinen Aspergillus-Hyphen als dichotom

verzweigte (45° Winkel) Hyphen mit Septen.<sup>61</sup> Die septierten Hyphen von *Aspergillus* werden am Besten von Methenaminsilber nach Gomori und Periodsäure-Schiff-Färbung erkannt. Auf jeden Fall ist es schwierig, Aspergillushyphen von denen von *Fusarium*spezies, *Pseudallescheria boydii*, *Phaeoohyphomycosis* und von ein paar anderen Schimmelpilzen zu unterscheiden. Eine definitive Diagnose erfordert eine histopathologische Evidenz von spitz verwinkelten Verzweigungen, septierten nicht-pigmentierten Hyphen und eine positive Kultur aus einer Gewebeprobe des betroffenen Organs.<sup>62</sup>

Beim Menschen hängt die antifungale Abwehr von intakten Mukosabarrieren, Makrophagen und Funktion der Neutrophilen ab.<sup>60, 61</sup> Eine Lokalantwort auf eingeatmete Aspergillussporen beinhaltet beim gesunden Menschen Phagozytose der Alveolarmakrophagen, die die Sporen vernichtet, bevor sie sich in potentiell invasive Hyphenformen verwandeln können und Neutrophile, die keimende Sporen und Hyphenformen, die zu groß sind, um von Makrophagen phagozytiert zu werden, inaktivieren.<sup>63</sup> Von Makrophagen stammenden Zytokine sind der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF- $\alpha$ ) und das Macrophage Inflammatory Protein (MIP-1 $\alpha$ ), welche entscheidend sind in der Abwehr fungaler Infektionen. Alveolarmakrophagen setzen TNF- $\alpha$  und MIP-1 $\alpha$  frei, wenn sie *Aspergillus*konidien exponiert werden. In der Neutropenie sind TNF- $\alpha$  und MIP-1 $\alpha$  reduziert. An nicht neutropenischen Mäusen wurde gezeigt, dass eine Hemmung durch Antikörper von entweder TNF- $\alpha$  oder MIP-1 $\alpha$  zu einer pulmonalen Invasion von Aspergillushyphen führt.<sup>60</sup> Darüber hinaus setzen Aspergillussporen Faktoren frei, die die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin 1 (IL-1) und TNF- $\alpha$  hemmen können.<sup>60, 64</sup> Die T-Zell-Funktion ist bei der Entwicklung einer invasiven Aspergillose bedeutend und es gibt zwei Arten der T-Helferzellen-Aktivierung bei Patienten mit einer invasiven Aspergillose. Die Th-1-Reaktivierung führt zu einem Anstieg von IFN- $\gamma$ , TNF und Interleukin 12 (IL-12) und hat einen protektiven Effekt auf die Infektion.<sup>60, 61, 65, 66, 67</sup> Die Th-2-Reaktivierung ist charakterisiert durch die Produktion von Interleukin 4 (IL-4), Interleukin 5 (IL-5) und Interleukin 10 (IL-10), der Stimulation von Mastzell/Eosinophilen-vermittelten Reaktionen und der Unterdrückung der Phagozytose-tätigkeit der Makrophagen/Neutrophilen, was zu einem Fortschreiten der Krankheit führt.<sup>60, 61, 66</sup>

### 1.3.4 KLINISCHE RISIKOFAKTOREN

Während Patienten nach autologer HSCT ein sehr geringes Risiko haben, an einer invasiven Pilzinfektion (IFI) zu erkranken, findet sich in der Patientengruppe nach allogener HSCT ein sehr viel höheres Risiko.

In Abhängigkeit von der epidemiologischen Umgebung können sowohl *Candida* als auch *Aspergillus* Spezies, die häufigsten Pathogene von systemischen Pilzinfektionen nach HSCT, und zunehmend *Non-Albicans Candida* und andere Organismen (z.B. *Mucor*, *Trichosporon*)<sup>38</sup> bereits in der frühen Posttransplantationsphase, der aplastischen Phase, auftreten. Gründe dafür sind 1. die Ansiedelung einer großen Menge an Sporen aus der Umwelt auf empfindlichen Membranen und 2. das Nichtvorhandensein einer effektiven phagozytischen Immunabwehr in Geweben, um das Keimen oder die Gewebsinvasion und Verbreitung zu verhindern.<sup>58</sup> Letzteres erklärt, warum eine verlängerte, schwere Neutropenie-Phase den Hauptrisikofaktor für eine frühe IA darstellt.

Nach dem Engraftment nimmt das Risiko einer IA aufgrund der persistierenden Immunsuppression aber noch erheblich zu.<sup>67</sup> Bei dieser so genannten späten IA spielt die Dauer der Kortikoidgabe und andere Immunsuppressiva bei Patienten mit mittel- bis schwerer akuten und chronischen GvHD eine gewichtige Rolle. Dies führt zu Schwächung der Phagozyten und Lymphozyten des Wirts.<sup>37, 32, 69</sup>

PBSCT führt zu einer schnelleren hämatopoetischen Rekonstitution als BMT, aber die Immuninkompetenz zurückzuführen auf GvHD und ihre Behandlung stellt dennoch einen wichtigen Risikofaktor für IFI dar.<sup>70, 71</sup> Wie die AlloPBSCT And Infectious/Non-infectious Complications Subcommittees Of The Grupo Español De Trasplante Hematopoyético (GETH)<sup>72</sup> untersuchte, sind die zwei stärksten Variablen, die das Risiko für eine späte Aspergillose erhöhen, das Auftreten einer GvHD Grad 2-4 und der Gebrauch von Steroiden.<sup>73</sup>

In drei großen vergangenen Studien trat die Erholung der Neutrophilen 5-6 Tage früher auf bei PBSCT<sup>70, 71, 74</sup>, (was möglicherweise das Risiko, an einer frühen *Non-Candida* IFI nach Transplantation zu erkranken, erniedrigte. Trotzdem birgt eine PBSCT ein ähnliches Risiko, eine akute GvHD zu bekommen wie BMT, und ein ähnliches bis höheres Risiko für eine chronisch extensive GvHD. Das Risiko einer

frühen Non-*Candida* IFI ist gering bei PBSCT, die meisten Infektionen treten spät auf, am günstigsten nach hämatologischer Erholung.

Die Durchführung einer Steroidprophylaxe und die Entwicklung einer moderaten bis schweren GvHD nach PBSCT (akut oder chronisch) sind die Hauptrisikofaktoren für eine Non-*Candida* IFI.<sup>72</sup>

Die Mortalität einer invasiven Aspergillose und anderen Non-*Candida* IFI ist sehr hoch bei PBSCT Patienten, ähnlich wie bei solchen mit BMT. Eine Non-*Candida* IFI ist auch der größte unabhängige Risikofaktor, nach einer PBSCT zu sterben.<sup>72</sup>

Als weitere wichtige Risikofaktoren sollen hohes Lebensalter der Patienten, fortgeschrittenes Krankheitsstadium, alternative Spendertypen, das Fehlen einer strengen Isolation der Patienten und eine unzureichende Luftfilterung des Patientenzimmers<sup>44</sup> gelten.

### **1.3.5 DIAGNOSE**

#### **1.3.5.1 DIAGNOSTIK-PROGRAMM**

##### **1.3.5.1.1 SCREENING VOR EINER MANIFESTATION ODER INFEKTION**

Das Ziel des diagnostischen Screenings ist die Lokalisation von möglicherweise vorher vorhandenen fungalen Manifestationen und Informationen über den Typ der kolonisierenden Agenzien. Der prädiktive Wert von „Überwachungskulturen“ (z.B. Pharyngeal-, Nasen- und Mundabstriche, Sputum, Stuhl) werden kontrovers diskutiert. Initialer abdomineller Ultraschall und Röntgen sind empfehlenswert. Serologische Tests sind optional. Reguläre Screening-Programme sind lediglich nötig bei Hochrisikopatienten.

### 1.3.5.1.2 DIAGNOSTISCHES VORGEHEN BEI FEBRILER NEUTROPENIE

Wenn Fieber auftritt, ist das diagnostische Routineverfahren von Tabelle 3 empfehlenswert. Antimikrobiologische Behandlung sollte sofort nach dem Anlegen von Blutkulturen beginnen und sollte durch weitere Diagnosemaßnahmen nicht hinausgezögert werden. Wenn die Entfieberung innerhalb 72-96 Stunden nicht durch antibakterielle Behandlung erreicht werden kann, müssen die diagnostischen Untersuchungen regelmäßig wiederholt werden, auch nach Beginn einer antifungalen Therapie. Die Aufdeckung anderer seltener Pathogene oder eine verspätete Identifikation einer invasiven Pilzinfektion ist bedeutend. Wenn *Candida* spp. aus Blutkulturen oder Zentralen Venenkathetern isoliert wurden, sind folgende Untersuchungen vorgeschrieben: a) serielle Blutkulturen während der Fieberphase, und zwei bis drei vor und nach der Antifungaltherapie, b) Ophthalmoskopie und abdomineller Ultraschall (plus MRT wenn notwendig) zu Beginn und nach der Erholung der Neutrophilen, und c) Echokardiographie (optional).

Zusammengefasst kann man sagen, dass für die frühe Diagnose einer invasiven Pilzinfektion einer Kombination verschiedener Methoden mit regelmäßigem Screening notwendig ist.<sup>75</sup>

#### Tab. 5.

Diagnostisches Vorgehen: Überblick

---

#### Vor Neutropenie

---

##### Notwendig

- Körperliche Untersuchung
- Abdomineller Ultraschall
- Röntgen; Thorax-CT, wenn notwendig
- CT der Sini bei Sinusitis in der Anamnese
- Information über vorherige Pilzinfektionen
- Proben von verdächtigen infektiösen Bereichen
- Weitere Diagnose anhand der Zeichen und Symptome

##### Möglich

- Fungale Serologie (ein Mal)
-

---

**Während Neutropenie**

---

**Notwendig**

- Körperliche Untersuchung (täglich)
- Proben von verdächtigen infektiösen Bereichen
- Weitere Diagnose anhand der Zeichen und Symptome

**Möglich**

- Fungale Serologie oder PCR (zwei Mal wöchentlich)
- 

**Bei Beginn von Fieber  
(nur bei Hochrisikopatienten)**

---

**Notwendig**

- Blutkulturen aus peripheren Venen/ZVKs
- Körperliche Untersuchung
- Abstriche von verdächtigen infektiösen Bereichen
- Stuhlkultur bei Durchfall

- Sputumkultur, wenn möglich
  - Urinkultur
  - Röntgen
  - Weitere Diagnose anhand der Zeichen und Symptome
- 

**Persistierendes Fieber >48-72 h**

---

**Notwendig**

- Blutkulturen aus peripheren Venen/ZVKs
- Körperliche Untersuchung
- Proben von verdächtigen infektiösen Bereichen
- Stuhlkultur bei Durchfall
- Sputumkultur, wenn möglich Urinkultur
- CT der Sini bei Verdacht auf eine Schimmelpilzinfektion
- Abdomineller Ultraschall; abdominelle MRT wenn nötig
- Weitere Diagnose anhand der Zeichen und Symptome

**Empfehlenswert**

- BAL bei pulmonaler Infiltration

**Möglich**

- Fungale Serologie, PCR
-

---



---

### Persistierendes Fieber >1 Woche

---

**Notwendig**

- Blutkulturen aus peripheren Venen/ZVKs
- Körperliche Untersuchung
- Abstriche von verdächtigen infektiösen Bereichen
- Stuhlkultur bei Durchfall
- Sputumkultur, wenn möglich
- Urinkultur
- CT der Sini bei V. a. eine Schimmelpilzinfektion
- Röntgen (ein Mal wöchentlich); Thorax-CT
- wenn nötig Biopsie von Organläsionen
- Abdomineller Ultraschall; abdominelle Magnetresonanztomographie (MRT) wenn nötig
- Weitere Diagnose anhand der Zeichen und Symptome

**Empfehlenswert**

- BAL bei pulmonaler Infiltration

**Möglich**

- Fungale Serologie, PCR
- 

Neben den konventionellen Analysen von Zeichen und Symptomen, mikroskopischen und kulturellen Techniken, Serologie, bildgebenden Verfahren, endoskopischen Methoden und Biopsien ist die Erkennung von Aspergillus Galactomannan (Platelia Aspergillus Elisa) und die PCR eine viel versprechende Methode, fungale DNA im Blut nachzuweisen.<sup>38</sup>

Trotz all dieser Schwierigkeiten unternahm die Invasive Fungal Infections Cooperative Group (IFICG) der European Organisation for Research on Treatment of Cancer (EORTC)<sup>76</sup> und die US Mycoses Study Group (MSG) den Versuch, Diagnosekriterien festzulegen, die dabei helfen sollen, eine gesicherte von einer wahrscheinlichen oder möglichen invasiven Aspergillose zu unterscheiden. Die Definition beinhaltet drei Elemente wie Patientenkriterien, klinische Major- und Minor-Kriterien, sowie mikrobiologische Kriterien.<sup>38</sup>

Hierbei gilt eine *invasive Aspergillose* als *gesichert* („proven“), wenn die histologische bzw. zytologische Untersuchung einer steril gewonnenen Gewebprobe (Nadelaspirat oder offene Biopsie) den für Aspergillen typischen Winkel von 45° verzweigten Hyphae zusammen mit einer Gewebealteration zeigt oder sich aus einer

---

normalerweise sterilen Gewebe- und/oder Flüssigkeitsprobe, die von einem klinisch und radiologisch sichtbar krankhaft verändertem Areal steril gewonnen wurde, *Aspergillus* kultivieren lässt.

Von einer *wahrscheinlichen Aspergillose („probable“)* spricht man, wenn mindestens ein so genanntes Patientenkriterium (siehe Tabelle 7a), ein mikrobiologisches Kriterium (siehe Tabelle 7b) und zusätzlich ein Major- oder zwei Minor-Kriterien aus der Gruppe der klinischen Kriterien (siehe Tabelle 7c) nachweisbar sind.

Sind mindestens ein Patientenkriterium (Tabelle 7a) und ein mikrobiologisches Kriterium (Tabelle 7b) oder ein Major- bzw. zwei Minor-Kriterien aus der Gruppe der klinischen Kriterien (Tabelle 7c) vorhanden, geht man von einer *möglichen invasiven Aspergillose („possible“)* aus.<sup>76</sup>

**Tab. 6a.**

Patientenkriterien

- 
- Neutropenie < 500/μl für mehr als 10 Tage
  - Persistierendes Fieber > 38°C trotz Breitbandantibiotika für mehr als 96 Stunden
  - Körpertemperatur > 38°C oder < 36°C zusammen mit prädisponierenden Faktoren wie prolongierte Neutropenie (>10Tage) in den letzten 60 Tagen, immunsuppressive Therapie in den letzten 30 Tagen, invasive Pilzinfektion in der Anamnese oder bestehenden HIV-Infektion
  - Symptome einer Graft-versus-Host-Disease
  - Behandlung mit Kortikosteroiden für mehr als 3 Wochen
- 

**Tab. 6b.**

Mikrobiologische Kriterien

- 
- Positive Kultur von *Aspergillus* aus Sputum und /oder BAL
  - Positive Kultur oder Mikroskopie aus Sinus-Aspirat
  - Positiver Nachweis von *Aspergillus*-Antigen in BAL, Liquor oder > 2 Blutproben
  - Pathologische Lungenveränderungen ohne kulturellen Nachweis von bakteriellen Erregern in Blut, Sputum, BAL
-

---

**Tab. 6c.**Klinische Kriterien

---

**Major-Kriterien:**

- Neu aufgetretene Lungeninfiltrate mit typischer Konfiguration in der Computertomographie („halo-sign“, „air-crescent-sign“ oder kavernöse Läsion in einem Konsolidierungsareal)
  - Radiologische Zeichen einer invasiven und/oder destruierenden Sinusitis
  - Radiologische Zeichen einer ZNS-Infektion
- 

**Minor-Kriterien:**

- Klinische Symptome einer Infektion der unteren Atemwege (Husten, Brustschmerz, Atemnot, Hämoptysis)
  - Pleurareiben im Auskultationsbefund
  - Neu aufgetretene pulmonale Infiltrate, die die Major-Kriterien nicht erfüllen
  - Klinische Symptome einer Sinusitis
  - Ulzerationen der Nasenschleimhaut
  - Periorbitale Schwellung
  - Nekrotische Herde am Gaumen und /oder Perforation des Gaumens
  - Fokale neurologische Symptome, Meningismus, Bewusstseinsveränderungen oder abnormer Liquorbefund ohne Nachweis bakterieller bzw. viraler Erreger oder maligner Zellen
- 

**Klinische Kriterien einer hämatogenen Pilzinfektion:**

- Papuläre oder noduläre Hautveränderungen ohne andere Erklärung
  - Zeichen der Chorioretinitis oder
  - Endophthalmitis mit für eine disseminierte Pilzinfektion typischem Erscheinungsbild
- 

Dennoch muss davor gewarnt werden, die Diagnose einer Aspergillose völlig auszuschließen, wenn diese Kriterien nicht erfüllt werden. Wie eine spanische Studie<sup>75</sup> belegt, zeigt de facto bei der postmortalen Untersuchung eine nicht unerhebliche Anzahl von Patienten den sicheren Beweis einer Aspergillose, obwohl sie zu Lebzeiten die festgelegten Kriterien nicht erfüllen. Nur 9% der Erkrankten wurden richtig klassifiziert. Und 64% erfüllten vor ihrem Tod weder ein mikrobiologisches, noch ein klinisches Major-Kriterium.

Die Kriterien der EORTC/MSG sind zwar also ein wichtiger Schritt vorwärts in der Standardisierung der Definition einer IPA (Invasive pulmonale Aspergillose) und finden ihre Verwendung in klinischen Studien, sollten aber in der klinischen

Entscheidungsfindung keine Rolle spielen. Eine antifungale Therapie ist in jedem Fall dringend zu empfehlen.

### **1.3.5.2 SYMPTOMATIK DER INVASIVEN ASPERGILLOSE**

Das erste und einzige Zeichen einer systemischen Pilzinfektion ist häufig Fieber, das mehr als drei bis sechs Tage auf Breitspektrantibiotika nicht anspricht. Ebenso wiederkehrende febrile Episoden nach initialer Entfieberung und/oder die Präsenz von pulmonalen Infiltraten während antibiotischer Behandlung.<sup>38</sup>

Allerdings hat eine signifikante Anzahl von Patienten auch gar kein Fieber, was auf den Gebrauch von konkomitanten Glukokortikoiden zurückgeführt werden kann.<sup>44</sup>

Die Lungen sind die Organe, die am häufigsten von einer Aspergillose betroffen sind (>90%), aber eine disseminierte Infektion kann gewöhnlich auch bei allogenen SCT beobachtet werden.<sup>44</sup> Im Falle einer pulmonalen Aspergillose treten meist pleuritische Brustschmerz, Husten oder Hämoptyse auf.<sup>38</sup>

Ebenso kann eine Sinusitis ein Hinweis auf eine Schimmelpilzerkrankung sein. Eine Ösophagitis wird meist durch *Candida* spp., hauptsächlich *Candida albicans* verursacht.

Des Weiteren kann ähnlich einer oralen Candidiasis eine schwere Mukositis eine Dysphagie und retrosternales Brennen nachahmen, das häufig nach hochdosiertem Cytosin-Arabinosid auftritt und die Diagnose einer ösophagealen Candidiasis kann nicht definitiv auf klinischen Symptomen begründet werden.

Hautinfiltration während Panzytopenie kann als thrombozytopenische Purpura fehlinterpretiert werden und kann sowohl durch Hefe- als auch durch Schimmelpilze verursacht werden. Die klinischen Zeichen einer hepato-splenischen Candidiasis (persistierendes Fieber, Hepatosplenomegalie, Anstieg der alkalischen Phosphatase), sowie einer fungalen Endophthalmitis (Uveitis posterior mit weißen Infiltraten des Glaskörpers) entwickeln sich typischerweise während oder nach der neutrophilen Erholungsphase. Bei systemischen Candidosen können auch andere Organe (z.B. Herz, Nieren, Knochen) betroffen sein. Bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen werden Mykosen des Zentralen Nervensystems (intrazerebrale Läsionen) gewöhnlich durch Schimmelpilze (*Aspergillus* Spezies)

verursacht, selten tritt eine Meningoenzephalitis auf, die durch *Cryptococcus neoformans* verursacht ist.

Alle neutropenischen Patienten mit neuen neurologischen Symptomen wie Anfällen, mentalen Veränderungen oder persistierenden Kopfschmerzen sollten ein CT bekommen, oder wenn möglich eine Magnetresonanztomographie des Gehirns.

Die zerebrale Aspergillose ist die wahrscheinlichste infektiöse Komplikation im Gehirn nach prolongierter und schwerer Neutropenie.<sup>38</sup>

### **1.3.5.3 LABORCHEMISCHE BEFUNDE UND BLUTBILD**

Blutkulturen sind manchmal positiv für *Candida* Spezies, selten aber für *Aspergillus* Spezies. *Aspergillus spp.*, die in klinischen Proben neutropenischer Patienten gefunden wurden, können eine systemische Infektion mit diesem Pathogen anzeigen.<sup>15</sup>

### **1.3.5.4 SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN**

Verlässliche Ergebnisse kann man mittels Kultur aus normalerweise sterilen Körperflüssigkeiten (z.B. Blut, Pleurapunktat, Liquor) und Biopsiematerial erhalten. Alle Pilze, die aus sterilen Bereichen gewonnen wurden, sollten in ihrer Spezies identifiziert werden. Neben der Tatsache, dass ungefähr 50% der Patienten mit einer durch Autopsie bewiesenen Candidiasis keine positiven Blutkulturen zu Lebzeiten hatten, ist das Gewinnen multipler Blutkulturen die Methode der Wahl, um Fungämien aufzudecken. In Blutkulturen können hauptsächlich Hefepilze isoliert werden. Um das sicherste Ergebnis zu erhalten, sollten mindestens zwei aerobe Blutkulturen kultiviert werden, anstatt einer aeroben und einer anaeroben. Die Methoden, die heutzutage benutzt werden (z.B. Bactec Mycosis-IC/F Medium), sollen angeblich *Candida spp.* in bis zu 60% aller Fungämien innerhalb 2-5 Tagen nachweisen.

Spezielle Methoden wie die Lyse-Zentrifugation (*Dupont Isolator*) können sogar die Erkennung von Pilzen verbessern, aber auch zu falsch-positiven Ergebnissen bei neutropenischen Patienten führen. Die Lyse-Zentrifugation wird nicht als

Standardmethode bei der Kultivierung von Pilzen in Blutkulturen bei neutropenischen Patienten betrachtet. Das Vorhandensein von Schimmelpilzen im Sputum muss als möglicher Indikator von Pilzpneumonien betrachtet werden, Hefepilze aber gehören zu der physiologischen Flora des Magen-Darm-Trakts und sollten als Kontamination betrachtet werden, bis eine invasive Krankheit durch Lungenbiopsie nachgewiesen wurde.

Alle *Candida*-Isolate sollten in ihrer Spezies identifiziert werden, und nicht nur zwischen *C. albicans* und *non-albicans Candida* unterschieden werden. Verschiedener selektiver Differenzierungsagar (z.B. CHROMagar) ist mittlerweile erhältlich und hilft dabei, *Candida* Spezies je nach unterschiedlicher Farbe auf der Agarplatte schneller zu unterscheiden. Eine Pilzerkrankung bei einem symptomatischen Patienten ohne Urinkatheter kann als Indikation einer systemischen Pilzinfektion interpretiert werden. Materialien sollten auf speziellen Medien, die mit Antibiotika angereichert sind, kultiviert werden, bevorzugt bei 26°C und 37°C über eine längere Zeitperiode (mindestens 7 Tage). Der Gebrauch von angereicherten Medien, z.B. *Sabouraud-Bouillon* kann bei der Isolation von Pilzen nützlich sein. Die Referenz-Prozedur für das Testen von antifungalen Agenzien auf die Anfälligkeit gegen Hefepilze und Schimmelpilze ist in den *National Committee of Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) beschrieben. Vergleichbare Standards für Hefepilze in Deutschland wurden durch die *DIN Norm* (DIN 58940-84) eingeführt, lediglich das Medium (high resolution medium), das bei diesem Test verwendet wird, unterscheidet sich vom RPMI 1640 Medium bei den NCCLS Standards. In der Routinepraxis benutzen viele Mykologie-Labore den E-Test als gute Alternativmethode, da er leicht anwendbar und gut reproduzierbar ist.<sup>75</sup>

Beim Vorhandensein von pulmonalen Infiltraten, besonders bei diffusen Prozessen, kann die Bronchoskopie und bronchoalveolären Lavage (BAL) nützlich sein. Die BAL hat eine hohe Spezifität bei dieser Patientengruppe, leider aber eine niedrige Sensitivität. Sie liegt nur bei etwa 50%.<sup>75</sup>

Wenn Pilze in BAL-Proben gefunden werden, könnte es schwierig sein, zwischen einer Kontamination mit Pilzen aus dem Oropharynx und einer echten invasiven pulmonalen Infektion zu unterscheiden. Selbst bei invasiven pulmonalen Aspergillosen sind Kulturen aus BAL oft negativ. Leider haben alle serologischen

Untersuchungen, die es bislang gibt, eine geringe Sensitivität und oft auch eine geringe Spezifität für den Nachweis von Systemmykosen.<sup>15</sup>

Trotzdem, die Sensitivität, *Aspergillus* mittels Kultur nachzuweisen, ist gering. Neue serologische Techniken können diese Situation vielleicht verbessern.

#### **1.3.5.4.1 NACHWEIS VON ANTIKÖRPERN**

Mehrere Antikörper- und Antigen-Testmethoden wurden für die Diagnose von invasiven Candidosen oder Aspergillosen eingeführt. Die Antikörpertests haben eine Sensitivität im Bereich von 17-90% und sind meist nur nützlich in Kombination mit Antigentests. Des Weiteren können derzeit erhältliche Antikörpertests eine verzögerte oder gesteigerte Reaktion bei immunsupprimierten Patienten zeigen. Antigentests sind gebräuchlich bei *Candida* und *Aspergillus* Spezies, *Histoplasma* und *Cryptococcus neoformans*. Bei immungeschwächten Patienten kann das CSF-Antigen von *Cryptococcus* in vielen Fällen von Cryptococcus-Meningitis positiv sein. Diese Tests fokussieren sich auch hauptsächlich auf die Diagnose von Cryptococcus-Meningitiden bei AIDS-Patienten und nicht bei Patienten mit malignen Erkrankungen. Als Antigentest bei *Candida* wird häufig der „*Cand-Tec*“ verwendet, ein Latexagglutinationstest mit einem nicht speziell definierten Antigen. Es wurde eine Sensitivität von bis zu 70% (Bereich 30-70%) und eine Spezifität von 88% dokumentiert. Die neueste und sensitivste Methode ist ein *ELISA-Test*, der *Candida mannan*-Antigene erkennt.

Routineuntersuchungen nach *Candida*-Antikörpern oder -Antigenen sind allerdings nicht empfohlen bei Patienten mit hämatoonkologischen Erkrankungen.

*Aspergillus*-Antikörper sind bei immungeschwächten Patienten oft nicht nachweisbar.

#### **1.3.5.4.2 NACHWEIS VON ZIRKULIERENDEM GALAKTOMANNAN/GM**

Trotzdem hat das Testen nach Antigenen viel versprechende Ergebnisse erzielt. Für den Galactomannan-Assay (*Pastorex*® *Aspergillus*) wurde eine Spezifität zwischen 90 und 100% und eine Sensitivität von 26-76% dokumentiert. Außerdem wurden mit

dem ELISA-Test nach Galactomannan (*Platelia*® *Aspergillus*) gute Ergebnisse erzielt. Auf mehrere Studien und zwei großen klinischen Serien bei neutropenischen Patienten basierend zeigte der Test eine Sensitivität zwischen 80-100% und eine Spezifität von >90% mit einem positiv prädiktiven Wert von 87,5%.<sup>75</sup> *Sulahian et al.*<sup>77</sup> berichtete von der Erkennung von zirkulierenden Galactomannan (GM)-Antigenen bei vielen Patienten vor dem Auftreten klinischer Symptome und radiologischer Zeichen einer IA. Galctomannan im Serum ist transient und es wird empfohlen, zwei Mal wöchentlich Tests durchzuführen.<sup>75</sup>

Galactomannan ist ein Bestandteil der fungalen Zellwand und kann im Urin oder Serum gemessen werden. Es wurde angezeigt, dass zwei positive Tests in Folge eine IA bei Hochrisikopatienten indizieren und eine Indikation für radiologische Untersuchungen darstellen (z.B. hochauflösende CT der Brust).<sup>44</sup>

#### **1.3.5.4.3 NACHWEIS VON ZIRKULIERENDEM (1-->3)- $\beta$ -D-GLUKAN**

Eine andere neue Methode für eine serologische Diagnose ist der so genannte G-Test für die Detektion von 1-3-beta-D-Glucans (*Fungitec*® G). Die Daten für Sensitivität und Spezifität sind leider begrenzt.

Bei Patienten mit hämato-onkologischen Erkrankungen wird eine Routineuntersuchung nach *Aspergillus*-Antikörpern allerdings nicht empfohlen, hier sind Antigenerkennungen mit dem ELISA-Galactomannan-Test von Nutzen.<sup>75</sup>

#### **1.3.5.4.4 NACHWEIS VON ASPERGILLUS-DNA MITTELS PCR**

Seit den frühen Neunzigern wurden mehrere Methoden für den Nachweis von pilzspezifischer DNA durch die Hybridisierung und Amplifikation von Nukleinsäuren entwickelt. Zwei Ansätze wurden bislang untersucht, erstens, nach genus-spezifischen Genomsequenzen sowie Single-copy-Genen zu schauen und zweitens, nach Multiple-copy-Genen, die in fast allen fungalen Spezies nachgewiesen werden konnten. Primer des 18ssu-rRNA Subunit Gens, des 28S rRNA Gens oder mitochondrialen Genen wurden als so genannte „Panfungus PCR“ untersucht. Der Panfungus PCR folgt einer Hybridisierung mit spezies-spezifischen Proben, um eine

adäquate Spezifität zu erhalten. Die Panfungus PCR, die die Sequenz des 18S rRNA Gens benutzt, und die anschließende spezies-spezifische Hybridisierung mit probes für *Candida* Spezies und *Aspergillus* Spezies wurden sehr extensiv in mehreren klinischen Studien bei hämatoonkologischen Patienten untersucht. Die Spezifität liegt zwischen 65-75%, abhängig von der Zahl der Tests, die gebraucht werden, um eine Diagnose mit einer Sensitivität von 100% zu erreichen.<sup>75</sup> Falsch-positive Ergebnisse beruhen auf Kontamination.<sup>44</sup>

Der Spezies-spezifische Ansatz mit einer two-step PCR mit Primern, die von einer variablen Region des 18S rRNA Gens ausgehen, das hoch konzentriert bei *Aspergillus* Spezies ist, wurde mit BAL und Blut getestet. Die Spezifität des Tests lag bei 89%. Der Ansatz der molekularen Diagnostik ist sehr viel versprechend mit einer hohen Sensitivität und Spezifität; trotzdem ist die fungale PCR bis jetzt weder standardisiert noch allgemein gängig.<sup>75</sup>

### **1.3.5.5 MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG**

Alle Gewebe von Patienten mit eventueller IFI sollten mit fungalen Färbemitteln gefärbt werden. Bei direkten Präparationen, der Gramfärbung oder der Hämatoxylin-Eosin-Färbung, können Pilze leicht übersehen oder als Artefakte, Fibrinfilamente oder nekrotische Fasern falsch interpretiert werden. Hyphae werden am besten durch spezielle fungale Färbemittel dargestellt, bronchoskopisches Material oder Gewebsbiopsien müssen mit der PAS-Färbung (periodic acid Schiff reaction), oder der Silber-Methenamin-Technik (*Grocott*) untersucht werden. Nekrotische fungale Strukturen werden mit der *Grocott-Färbung* besser sichtbar als mit der PAS-Reaktion, aber mindestens eine dieser Färbemethoden sollte durchgeführt werden. Thrombosierte Gefäße in Biopsie- oder Autopsiematerial sollte immer sehr vorsichtig von einem Pathologen untersucht werden, zahlreiche Schnittpräparate sollten analysiert werden. Die Evidenz der Fluoreszenzmikroskopie, die einem optischen Aufheller wie dem *Calcofluor White-Färbung* (möglich in Kombination mit Kaliumhydroxid), ist eine wichtige Ergänzung zu den oben aufgelisteten Methoden und kann möglicherweise schnelle Diagnosen erlauben. Liquor sollte kultiviert und auf *Cryptococcus neoformans*-Antigen getestet werden. *Cryptococcus neoformans* in Liquor wird durch direkte Färbung zusätzlich zu einem Antigentest durch den

Agglutinationsassay erkannt. Mikroskopische Unterscheidung zwischen Hefen und Hyphomyzeten kann leicht erlangt werden. Bei der direkten Untersuchung von hyphalen Pilzen sind wichtige Parameter die Formation des Septums, Durchmesser und Ramifikation der Hyphen. Die mikroskopische Unterscheidung zwischen *Aspergillus spp.* und *Mucoraceae* kann durch eine immunhistochemische Untersuchung verbessert werden.

Trotzdem ist es nicht immer einfach, die Spezies klar zu identifizieren.<sup>75</sup>

### 1.3.5.6 LUNGENBIOPSIE

Wenn klinisch möglich, sollten auch Biopsien der verdächtigen Areale (Haut, Lungen, Leber) gemacht werden. Transkutane Nadelbiopsien von peripheren Lungengebieten haben einen diagnostischen Wert von 50-80% und die Komplikationsrate ist niedrig. Leberbiopsien auf der anderen Seite sind pathogenetisch weniger aussagekräftig.<sup>75</sup>

Invasive Untersuchungsmethoden sind kontraindiziert beim klinischen Bild einer profunden Knochenmarksaplasie oder beeinträchtigten klinischen Voraussetzungen aufgrund einer akuten Pneumonie.<sup>78</sup>

Wenn möglich, sollte einer Autopsie post mortem gemacht werden, um wichtige epidemiologische Informationen zu erhalten.<sup>75</sup>

### 1.3.5.7 BILDGEBENDE VERFAHREN

#### Abb.4.

Radiologiebefund einer Aspergillose



In den letzten Jahren wurden auch zunehmend bildgebende Verfahren zur Diagnose von Pilzinfektionen eingesetzt. Wenn der klinische Verdacht einer Pilzinfektion besteht, sollten bildgebende Verfahren früh eingesetzt werden.<sup>15</sup>

Besonders mit Hilfe der Computertomographie sind charakteristische Zeichen einer invasiven Pilzinfektion oft früher zu erkennen als mit einer konventionellen röntgenologischen Untersuchung. Sie bestehen aus kleinen Knötchen mit einem Halo-Sign und ist in Gefäßnähe lokalisiert. Die Spezifität des Halo-Signs ist begrenzt, da mehrere Differentialdiagnosen wie Blutungen, Embolien und leukämische Infiltrate ebenso in Betracht gezogen werden müssen. Kavitationen und Air-Crescent-Zeichen (Luftsichelzeichen) treten typischerweise nach hämatopoetischer Rekonstitution auf<sup>75</sup> und können bei bis zu 75% der Patienten mit histologisch-gesicherter Aspergillose gesehen werden<sup>79, 80</sup>. Eine IA kann auch unspezifisch lokalisierte Infiltrate und Konsolidierung produzieren.<sup>79, 80</sup>

Bei Candidämien sind häufig Leber und Milz involviert. Eine zentrale echoreiche Läsion mit einem echoarmen Rand (Größe 5-20 mm) kann durch Ultraschall gefunden werden. Eine frühe Diagnose von Organinfiltrationen kann auch durch Computertomographie und Magnetresonanztomographie gestellt werden, wobei die MRT die sensitivere Methode zu sein scheint. Im Fall von neurologischen Symptomen ist in Notfällen auch ein Schädel-CT indiziert, andernfalls sollte eine MRT vorgezogen werden, weil die MRT die Methode der Wahl für die Untersuchung des zerebralen Parenchyms und der Meningen ist. Trotzdem ist für die Diagnose der paranasalen Sini die CT verlässlicher als die MRT, um die Knochenstruktur zu beurteilen. Konventionelle Bildgebungen der paranasalen Sini sollten vermieden werden, da es notwendig ist, die Ethmoidal- und Sphenoidalhöhlen darzustellen. Fungale Retinitis oder Endokarditis sind sehr selten bei neutropenischen Patienten, aber Ophthalmoskopie und Echokardiographie sollten durchgeführt werden, wenn eine Candidämie diagnostiziert wurde.<sup>75</sup>

In den seltenen Fällen einer hepatosplenischen Candidiasis können die typischen Veränderungen mittels Ultraschallsonographie der Leber und der Milz ebenfalls Aufschluss geben.<sup>15</sup>

### 1.3.6 **PROPHYLAXE UND THERAPIE**

Obwohl eine frühzeitige, empirische Antifungaltherapie bei neutropenischen Patienten mit pulmonalen Infiltraten, refraktorischem Fieber und pulmonalen Symptomen mit pulmonalen Infiltraten, die auf einem Thorax-CT erkannt werden können, zwingend erforderlich ist bei Hochrisikopatienten,<sup>38</sup> sollten diagnostische Untersuchungen sehr intensiv durchgeführt werden.

Die Identifikation von Pilzen ist wichtig für die Wahl der Antifungaltherapie und deren Dauer, chirurgische Intervention, Monitoring von fungalen Manifestationen oder eine sekundäre Antifungalprophylaxe.<sup>38</sup>

Während Fluconazole eine effektive Prophylaxe gegen Candida-Infektionen bietet, gibt es bislang keine bewiesene zufrieden stellenden prophylaktischen Maßnahmen gegen invasive Schimmelpilzinfektionen. Aspergillose ist die bedeutsamste Schimmelpilzinfektion, sowohl die Häufigkeit, als auch das Auftreten und die Prognose betreffend. Prophylaktische Vorgehensversuche, die bis jetzt durchgeführt wurden, wurden durch das relativ geringe Aspergilloserisiko der untersuchten Populationen erschwert, wodurch ein potentieller günstiger Effekt bei Hochrisiko-Subpopulationen verdeckt wurde.<sup>81</sup>

Der Zeitpunkt, zu dem der Patient ein Risiko für eine Aspergillose hat, ist variabel und nicht auf die neutropenische Episode beschränkt.<sup>81</sup>

---

## **1.4 CYTOMEGALOVIRUS-INFEKTION**

### **1.4.1 EPIDEMIOLOGIE**

#### **1.4.1.1. INZIDENZ**

Weltweit sind etwa 70-90% der Menschen mit CMV infiziert, etwa 50% in den Industrieländern und nahezu 100% in den Entwicklungsländern Afrikas und Asiens.<sup>82</sup> Mit dem Alter nimmt die Prävalenz zu, bei Sechzigjährigen liegt die Durchseuchungsrate bei 60%.<sup>83</sup>

Eine CMV-Infektion ist allerdings nicht mit einer CMV-Erkrankung zu verwechseln. Der Prozentsatz der tatsächlich Erkrankten ist wesentlich geringer.

Die HCMV-Übertragung ist die häufigste kongenitale Infektion, etwa 1% aller Neugeborenen ist mit HCMV infiziert. Ursache ist meist eine primäre Infektion der Mutter während der Schwangerschaft. 7-10% der infizierten Säuglinge entwickeln eine HCMV-Erkrankung mit Petechien, Ikterus, Hepatosplenomegalie, Chorioretinitis und z.T. bleibenden neurologischen Störungen wie motorische Defizite, geistige Retardierung und Schwerhörigkeit bis zur Taubheit. Etwa 10% der Erkrankten versterben.<sup>84, 85</sup>

CMV-Infektion und CMV-assoziierte Erkrankungen sind vor allem bedeutsame Komplikationen nach Stammzelltransplantation mit einer hohen Mortalitätsrate, besonders in Fällen einer interstitiellen Pneumonie. Die bekannten Risikofaktoren für eine CMV-Reaktivierung und –Krankheit sind hier CMV-Seropositivität des Empfängers oder Spenders, akute GVHD, HLA-Mismatch, Alter und T-Zell Depletion.<sup>86, 87, 88-93</sup> In mehreren Studien wurde belegt, dass in etwa 55% der CMV-seropositiven Patienten, die eine präemptive Therapie mit Ganciclovir erhielten, eine CMV-Reaktivierung zeigen.<sup>88, 90, 94, 93</sup>

Werden CMV-seronegative Blutprodukte benutzt und die Leukozyten gefiltert, was die Transfusionsübertragung von CMV reduziert, wird die Inzidenz einer Reaktivierung erheblich verringert.<sup>95</sup>

Bei HSCT-Empfängern tritt eine CMV-Infektion typischerweise 30-100 Tage nach Transplantation auf, wenn keine Prophylaxe mit Ganciclovir oder eine präemptive Therapie durchgeführt wurde.<sup>96, 97, 98</sup> Nach dem Engraftment kommt es möglicherweise durch inkomplette Immunrekonstitution oder durch Immunsuppression assoziiert mit GvHD und ihrer Behandlung zu einer Erkrankung.

Die Inzidenz der CMV-Krankheit hat die letzten Jahre zwar abgenommen, was aber nicht ausschließlich auf den Einsatz einer prophylaktische Therapie zurückgeführt werden kann, da diese aufgrund ihrer Toxizität keinen uneingeschränkten Vorteil für das Überleben bietet.<sup>99-101</sup> Darüber hinaus wird aufgrund einer frühen prophylaktischen antiviralen Therapie das erstmaligen Auftreten einer CMV-Krankheit auf die späte Posttransplantationsphase verschoben<sup>99-103, 186</sup>. Vor allem bei Patienten mit GvHD hat die Inzidenz einer späten CMV-Krankheit, die im Mittel 156 Tage nach Transplantation auftrat, zugenommen.<sup>186</sup>

Letztlich kann die antivirale Therapie darin versagen, den Ausbruch einer progressiven CMV-Krankheit zu verhindern.<sup>101, 104, 105</sup>

#### **1.4.1.2 LETALITÄT**

CMV-Infektionen sind auch heute noch trotz Kombinationstherapien aus Ganciclovir und Hochdosisimmunglobulinen ein bedeutender Grund für Morbidität und Mortalität nach allogener Stammzelltransplantation.<sup>106</sup> Die Mortalitätsrate liegt immer noch bei 30 - 48 %.<sup>107</sup> Hauptgrund hierfür ist die interstitielle Pneumonie.<sup>108</sup> Ohne eine spezifische Therapie verläuft sie bei bis zu 85% letal.<sup>109</sup>

### **1.4.2 ÄTIOLOGIE**

#### **1.4.2.1 ERREGER**

Das humane Cytomegalovirus (HCMV), auch humanes Herpesvirus Typ 5 (HHV-5) genannt, gehört wie die animalen CMV zur Familie der Herpesviridae, Subfamilie

Betaherpesviridae, Genus Cytomegalovirus. Die Namensgebung erfolgte in Anlehnung der Eigenschaft des Virus, die infizierten Zellen zu vergrößern (Cytomegalie) und charakteristische Einschlusskörperchen zu induzieren.



**Abb. 5.**

CMV-Virion

Das Genom des HCMV besteht aus doppelsträngiger DNA mit einer Größe von 230.000 Basenpaaren. Umgeben wird es von einem ikosaedrischen Kapsid (100-110 nm Durchmesser, 162 Kapsomeren). Zwischen Kapsid und Virushülle, welche aus zellulären Membranen aufgebaut ist, findet sich eine Proteinschicht, Tegument genannt. In die Lipiddoppelmembran sind mindestens acht verschiedene virale Glykoproteine eingelagert. Das reife Viruspartikel misst 150-200 nm im Durchmesser. Herpesviren sind generell sensibel gegenüber niedrigen pH-Werten, hohen Temperaturen und Lipidlösungsmitteln. Bei Körpertemperatur hat HCMV eine Halbwertszeit von 60 Minuten. Zur Erhaltung der Infektiosität sollte eine Lagerung bei mind. -70 °C erfolgen.

Herpesviren können sich im lytischen Infektionszyklus oder in der Latenz befinden, die zu einer lebenslangen Infektion des Wirts führt. Charakteristisch für Betaherpesviren sind der langsame Vermehrungszyklus, die hohe Wirtsspezifität und die Ausbreitung der Infektion von Zelle zu Zelle auch in Gegenwart von neutralisierenden Antikörpern.

Die lytische Infektion von Zellen lässt sich mit Hilfe von Proteinexpressionsmustern und der Vermehrung der Nukleinsäure nachweisen. Die sehr frühen Proteine (*immediate early, IE*) sind verantwortlich für die Regulation der frühen (*early, E*) und späten (*late, L*) Proteine.

Mit Hilfe der viralen Glykoproteine adsorbiert der Virus an die Wirtszelle, woraufhin es zu einer Fusion der Virushülle mit der Zellmembran kommt. Nach dem Eindringen

des Kapsids in die Zelle und dem Transport zum Kern erfolgt die Freisetzung des Genoms. Die RNA-Polymerase II der Wirtszelle ermöglicht die Transkription der IE-Proteine im Zellkern. Die Tegumentproteine des infizierenden Viruspartikels wirken als Transaktivatoren für die IE-Gene.

Die weiteren Schritte der Virusvermehrung werden von den IE-Proteinen reguliert. Ebenso die Expression und Erkennung der HLA-Antigene (MHC-Klasse-I-Proteine). In Zellkulturen dienen IE-Proteine (vor allem das Phosphoprotein pp65) als frühe Marker der Virusinfektion.

Die HCMV-kodierte DNA-Polymerase ist ebenfalls ein frühes E-Protein. Ihre Aktivität kann mittels antiviraler Substanzen spezifisch gehemmt werden.

E-Proteine regulieren auch die Synthese der Strukturproteine (L-Proteine). Im Zellkern erfolgt das Zusammensetzen der viralen Kapside, Ort der Ausschleusung und Umhüllung der Viren ist hauptsächlich die innere Kernmembran. HCMV ist stark zellassoziert. Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern zeigen Unterschiede zwischen Virusstämmen und -isolaten auf. Mit Hilfe primärer Isolate und den korrespondierenden Seren der Patienten konnte nachgewiesen werden, dass stammspezifische neutralisierende Antikörper gebildet werden.<sup>110</sup>

HCMV findet seinen Weg parenteral – durch Stammzell-/Organtransplantation, über zellhaltige Blutkomponenten - oder über Schleimhautkontakte seinen Weg in den Organismus. Das Virus wird transplazentar, intrauterin (kongenitale Infektion), über zervikale, vaginale Sekrete sowie Muttermilch (peri- und postnatale Infektion), sexuell (zervikale Sekrete, Samen) oder über Speichel übertragen. Bei Transplantierten kommt es zur primären oder sekundären Infektion meist durch die transplantierten Gewebe oder Organe oder zellhaltige Blutprodukte.<sup>84, 111, 112</sup>

Nach einer Inkubationszeit von 4-8 Wochen kommt es zu einer Virämie, in der der Virus aber überwiegend zellgebunden bleibt. Die zellassozierte Virusreplikation findet in diversen Zelltypen (z.B. mononukleäre Zellen, epitheliale Zellen, Endothelzellen, verschiedene Parenchymzellen) statt.<sup>113</sup>

Duktale Epithelien der Speicheldrüsen, sowie Nierenepithelien und Genitalorgane werden hauptsächlich befallen.<sup>114</sup> So wird HCMV in der Virämie in Muttermilch, Speichel, zervikalen und vaginalen Sekreten, Samen und Urin ausgeschieden. Die Primärinfektion geht dann in einen Latenzzustand über, ungeachtet dessen, ob sie asymptomatisch oder wie bei Risikopatienten mit schweren Symptomen verlief. Die

zellulären Latenzorte sind wahrscheinlich wie oben bereits erwähnt CD34-positive hämatopoetische Progenitorzellen und CD13/CD14 positive Monozyten im peripheren Blut. <sup>115-118</sup>

Prinzipiell muss zwischen einer HCMV-Infektion und HCMV-Erkrankung unterschieden werden. HCMV hat direkte zytotoxische Wirkungen auf Gewebe und Organe, schädigt aber auch durch indirekte, HCMV-induzierte immunpathologische Phänomene wie Immunsuppression und die Bildung proinflammatorischer Zytokine.

85, 113

### **1.4.2.2 PATIENTENGRUPPEN**

#### **1.4.2.2.1 PRÄNATALE INFEKTION**

1-2 % der Neugeborenen sind mit CMV infiziert. 90% davon erscheinen klinisch gesund, 10% erscheinen symptomatisch. Davon haben wiederum 50% leichte reversible Krankheitszeichen wie Hepato- und Splenomegalie mit oder ohne Ikterus und Petechien. Die übrigen 50% leiden unter irreversiblen Veränderungen wie gastrointestinale Dysfunktionen (ösophagiale und biliäre Atresie, Stenosen des Ileums oder Kolons, Malformation des Pylorus), neurologischen Störungen (Schwerhörigkeit, Innenohrtaubheit, damit assoziierte Sprachprobleme, Enzephalitis, psychomotorische Retardierung, Paralyse), intrakraniale Kalzifikationen sowie körperliche und geistige Entwicklungsrückstände. Selten sind die Neugeborenen nicht lebensfähig. <sup>119</sup> 10-20 % dieser Kinder sterben im Verlauf ihrer Kindheit. <sup>120</sup>

Bei den anderen verbleiben permanente Abnormalitäten wie Retardierung, Wachstums- und Lernstörungen oder sensoneurale Taubheit. Manchmal kommt es zu einem Spätsyndrom mit psychomotorischer Retardierung im Alter von 2 Jahren. Je früher die Infektion der Mutter während der Schwangerschaft mit CMV erfolgt, desto massiver sind die Symptome. <sup>121</sup>

---

#### **1.4.2.2.2 POSTNATALE INFEKTION**

##### **1.4.2.2.2.1 INFEKTION EINES IMMUNKOMPETENTEN WIRTS**

Ein intaktes Immunsystem bekämpft den Virus erfolgreich, was dazu führt, dass eine Infektion meist asymptomatisch verläuft. Nur in < 1% der Infizierten zeigen sich grippeähnliche Symptome wie Fieber oder milde Hepatitiden, ein Mononukleose ähnliches Syndrom mit sehr selten unerklärlichen Fieberschüben, Tonsillitis, Pharyngitis, Splenomegalie, leichte Erhöhung der Transaminasen, Lymphadenopathie und/oder Arthralgie.<sup>122</sup>

Trotzdem sind auch beim immunkompetenten Patienten systemische Manifestationen möglich. So wurde bereits von ikterischer Hepatitis, fulminanter massiver Lebernekrose, meningitischen und enzephalitischen Symptomen wie auch von einem Laundry-Guillain-Barré-Syndrom im Sinne einer postinfektiösen Erkrankung, Schädigungen des Gastrointestinaltraktes und Ulzera vom Ösophagus bis zum Kolon berichtet.<sup>122</sup>

##### **1.4.2.2.2.2 INFEKTION EINES IMMUNSUPPRIMIERTEN WIRTS**

Unter einer Immunsuppression leiden in der Regel Transplantierte, HIV-infizierte Patienten sowie Patienten mit kongenitalen Immundefekten. Sie haben ein sehr viel größeres Risiko an einer Primärinfektion oder Reaktivierung zu erkranken. Die Mortalität kann mitunter 80-90 % betragen.<sup>119</sup> Bei HIV-Infizierten ist das Auftreten einer CMV-Erkrankung ein Zeichen für das Stadium des AIDS-Vollbildes, denn eine CMV-Erkrankung ist eine AIDS-definierende Erkrankung. Das Auftreten der Erkrankung weist eine eindeutige Korrelation mit der Ausprägung der Immunschwäche auf. Ein Abfall der CD4-positiven T-Lymphozyten < 50-100/µl sind Grund zur Sorge. Bei HIV-Patienten streut CMV weit, verläuft oft chronisch und führt zu häufigen Rezidiven, multiviszeralen Lokalisationen und schwerwiegenden Veränderungen an diversen Organsystemen. Gastrointestinale Störungen beinhalten Störungen vom Ösophagus bis zum Rektum, was Kolitis, Ulzera mit Diarrhö, Abdominalschmerzen, Gewichtsverlust und Blutungen bedeuten kann. Auch die

Nebennieren, das Zentrale Nervensystem (Enzephalitis), seltener auch die Lungen werden mitunter in Mitleidenschaft gezogen.<sup>123</sup>

Die *CMV-Retinitis* ist die häufigste klinische Komplikation einer CMV-Reaktivierung und kann bis zur irreversiblen Erblindung führen. Nachfolgend wird darauf noch näher eingegangen werden.

Die durch CMV bewirkte Immunsuppression kann es im Verlauf zusätzlich zu bakteriellen oder fungalen Superinfektionen kommen. CMV-bedingtes Organversagen kann schließlich zum Tod führen. Das Einführen der HAART („Highly active antiretroviral therapy“) mit Proteaseinhibitoren und Hemmstoffen der HIV-Reversen-Transkriptase hat zu einem starken Rückgang der opportunistischen Effekte, u.a. der CMV-Retinitis, geführt.<sup>124</sup>

Für Transplantierte ist der Cytomegalovirus immer noch ein ernsthafter Grund für Morbidität und<sup>96, 125</sup> Die gegebenen Immunsuppressiva gegen Abstoßungsreaktionen begünstigen die Aktivierung und das Umsichgreifen des Virus. Dieser relativ beeinflussbare Faktor und der Infektionsstatus von Spender und Empfänger sind die entscheidenden Faktoren, die über die Entwicklung einer Erkrankung entscheiden. Tabelle 8 zeigt das Risiko von Empfängern solider Organtransplantate anhand zweier Studien auf.

**Tab. 7.**

Prozentuale Darstellung des CMV-Erkrankungsrisikos in Abhängigkeit vom serologischen Status von Organempfänger und –spender (keine Stammzelltransplantation)<sup>126</sup>

Serostatus		Risiko einer CMV-Erkrankung in %
Organempfänger	Organspender	
-	+	~ 71 % (größtes Risiko für Primärinfektion)
+	-	~ 56-58 % (leichterer Krankheitsverlauf)
+	+	~ 63-68 % (leichterer Krankheitsverlauf)
-	-	~2% (niedrigstes Risiko)

Bei Stammzelltransplantierten, auf die noch gesondert eingegangen werden wird, sieht die Risikoverteilung anders aus. Hier haben seropositive Empfänger mit seronegativem Spender das größte Erkrankungsrisiko.

Die kritische Phase ist die ersten vier Monate nach Transplantation. <sup>127</sup>

In der ersten Virämiephase ist das Virus noch weitgehend zellgebunden. Nach ungefähr drei Monaten wird die starke Immunsuppression wieder langsam reduziert und es stellt sich wieder ein stabileres Gleichgewicht zwischen Immunsystem und der damit verbundenen zellulären Immunantwort und Virus ein. Somit nimmt das Risiko einer Erkrankung wieder ab.

Bei Transplantierten lässt sich die Diagnose meist nicht allein anhand klinischer Symptome sichern. Die Schwierigkeit besteht darin, die Infektion infolge indirekter Effekte von einer akuten oder chronischen GvHD zu unterscheiden. Das Cytomegalievirus kann darüber hinaus eine Triggerung der Abstoßungsreaktion bewirken. Daraus ergibt sich dann ein Teufelskreis. CMV fördert die Abstoßung. Und die Antiabstoßungstherapie fördert CMV. Die CMV bedingte Immunsuppression hat außerdem pathogenetische Bedeutung für das Auftreten von Superinfektionen oder persistierender Infektionen sowie Epstein-Barr-Virus assoziierter lymphoproliferativer Erkrankungen wie die Posttransplantationslymphome.

Die auftretenden Symptome sind oft - wenn sie auftreten – uncharakteristisch wie allgemeines Krankheitsgefühl, Fieber, leichte Gliederschmerzen oder Nachtschweiß. Durch Knochenmarksbefall kann es zu einer Leukopenie kommen („CMV-Syndrom“). Es können aber sämtliche wichtigen Organe und Organsysteme wie Lunge, Niere, Darm, Leber, Nebenniere oder auch Gehirn betroffen sein. Die *CMV-Retinitis*, die bei AIDS-Kranken eine große Rolle spielt, tritt eher selten auf. <sup>128</sup>

### **1.4.2.3 KRANKHEITSBILDER**

#### **1.4.2.3.1 DIE PRIMÄRINFEKTION**

Von der Primärinfektion können drei unterschiedliche Altersgruppen betroffen sein. CMV ist die Hauptursache von intrauterinen Infektionen in der Schwangerschaft und

wird sehr viel häufiger übertragen als andere Erreger pränataler Erkrankungen wie Röteln oder Toxoplasmose.<sup>129</sup>

- *Pränatale Infektion*: Sie tritt nach einer primären oder Reinfektion oder – seltener- Reaktivierung einer bereits vor der Schwangerschaft erworbenen Infektion der Mutter auf.<sup>111</sup>
- *Perinatale Infektion*: Infektion des Neugeborenen bei der Passage durch den Geburtskanal, durch virushaltige Muttermilch oder durch Austauschtransfusionen
- *Postnatale Infektionen*: Kontaktinfektion (Speichel, Urin) auf sexuellem Weg, durch Transfusionen oder Transplantation

#### **1.4.2.3.2 DIE REAKTIVIERUNG**

Nach einer primären (lytischen) Infektion verbleibt der Virus im Wirtsorganismus in einem sog. Latenzzustand, wird aber unter bestimmten Umständen reaktiviert und die infektiösen Virionen erscheinen dann im Blut, im Speichel und/oder im Urin. Zelluläre Zielorte sollen CD34-positive hämatopoetische Progenitorzellen und CD13/CD14 positive Monozyten im peripheren Blut sein.<sup>118</sup> Im gesunden Organismus stellt sich ein Gleichgewicht zwischen der CMV-Replikation auf der einen Seite und der Immunantwort des Wirtes auf der anderen Seite ein.

Kommt es nun zu einer Änderung des Immunstatus, kann es zu einer Reaktivierung kommen. Mögliche Ursachen sind beispielsweise Interaktionen mit anderen Viren (z.B. Humanes-Herpesvirus-6), bakterielle Infektionen oder eine Schwangerschaft. Im Rahmen einer Transplantation auch immunsuppressive Medikamente, eine GvHD oder lymphozytäre Antikörper.<sup>120</sup>

### 1.4.2.3.3 DIE REINFEKTION

Klinisch ist die Reinfektion von der Reaktivierung nicht zu unterscheiden. Sie wird bedingt durch einen Cytomegalovirus unterschiedlicher Antigenstruktur bei einem bereits seropositiven Organismus.<sup>83</sup>

Krankheitssymptome kommen bei Immunsupprimierten sowohl bei Primärinfektionen als auch Reaktivierungen vor. Die Krankheitsbilder variieren von asymptomatischen oder leichten, fieberhaften Infekten bis zu schweren Organmanifestationen wie die interstitielle CMV-Pneumonie, gastrointestinalen Ulzerationen, Hepatitis, Retinitis oder Enzephalitis. In manchen Studien ist außerdem die Rede von arteriellen Verschlüssen, z.B. der Nieren- oder Koronararterien, in dem jeweiligen Organempfänger. In den arteriosklerotischen Plaques wurde CMV immunhistologisch nachgewiesen. Eindeutige Beweise fehlten allerdings. Inzwischen wird *Chlamydia pneumoniae* mit arteriosklerotischen Plaques assoziiert.<sup>130</sup>

Da Abstoßungsreaktionen oft einen ähnlichen Krankheitsverlauf wie CMV-Infektionen aufweisen, müssen sie – da sie unterschiedliche therapeutische Maßnahmen erfordern - differentialdiagnostisch gut abgegrenzt werden.

Bei HIV-Infizierten ist die CMV-Retinitis die häufigste Manifestation. Sie verläuft kontinuierlich und kann zur Erblindung führen. Seit Einführung der antiretroviralen Kombinationstherapie ist ihre Inzidenz allerdings stark zurückgegangen.<sup>124</sup>

### 1.4.2.3.4 CMV-PNEUMONIE

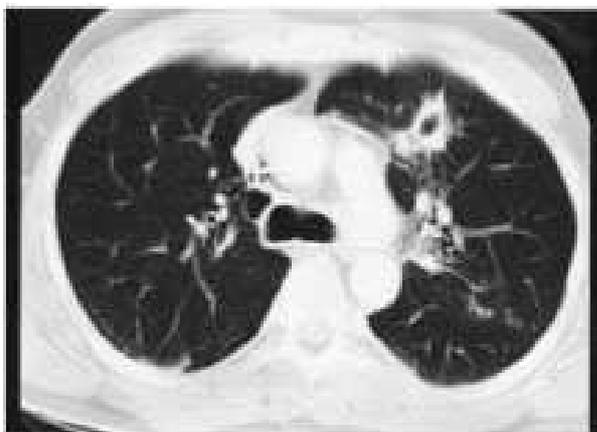


Abb.6.

Radiologischer Befund einer CMV-Pneumonie

Die CMV-Pneumonie ist eine der häufigsten infektiösen Komplikationen bei Transplantations- und AIDS-Patienten. Sie ist zusammen mit anderen viralen Pneumonien und der *Pneumocystis-carinii*-Infektion (PCP) die häufigste interstitielle Pneumonie bei Immunkomprimierten. Unbehandelt kann sie bei bis zu 50% von Knochenmarkstransplantierten, die eine Virusreaktivierung zeigen, auftreten.<sup>109</sup>

Dabei ist ihre Pathogenese noch nicht völlig geklärt. Wahrscheinlich bedingt die virale Toxizität von CMV eine Schädigung des Lungenparenchyms. Darüber hinaus mögen viral getriggerte Pathomechanismen autoimmuner Art eine Rolle spielen. Je nachdem ob sich das Virus primär intrapulmonal oder sekundär nach vorangegangener Virämie in der Lunge ansiedelt unterscheidet man die beiden Manifestationsformen interstitielle Pneumonie und diffuse alveoläre Schädigung.

Korrelierend zum histologischen Befund können radiologisch entweder fokal noduläre oder diffuse, bilateral verteilte, milchglasartige Verdichtungen (ground-glass opacity – GGO) oder Septenverdickungen gesehen werden. Die Septenverdickungen als Zeichen eines Lymphödems erscheinen manchmal vor den GGO in zentrilobulärer Lage. Durch Konfluierung kommt es im weiteren Verlauf zum Vollbild einer bilateralen Verschattung der Lunge. Auch ein retikuläres Verdichtungsmuster, welches oft mit kleinnodulären Infiltraten assoziiert ist und je nach Alter der Pneumonie variiert, ist zu sehen. Chronische Verläufe bei Patienten mit geringerer Immunabwehrschwäche können zu einer sog. Karnefizierung führen. Folge kann eine Bronchiolitis obliterans mit organisierender Pneumonie (BOOP) sein. Die CMV-Infiltrate sind meist über beide Lungen gleichmäßig verteilt, selten sind sie fokal oder einseitig manifestiert. Sie ändern sich rasch in Dichte und Ausdehnung. Bei Patienten mit langzeitiger Immunsuppression, z.B. bei chronischer GvHD, enden CMV-Pneumonien manchmal schon nach wenigen Tagen letal.

Eine Diagnose durch Lungenbiopsie (intrazelluläre CMV-Inklusionen) oder Bronchioalveolarlavage (Viruskulturen auf Fibroblasten) ist nicht immer möglich.

Eine Therapie erfolgt meist nach dem Auftreten klinischer Symptome, einer ansteigenden Antigenämie und CT-Merkmalen einer interstitiellen Pneumonie.

Differentialdiagnostisch schwer abzugrenzen sind gerade bei immunsupprimierten Patienten Aspergillose oder PCP. Andere virale Pneumonien wie HSV, RSV, ADV und Influenza sind meist nicht zu differenzieren. Für Herpes- und Influenzaviren sprechen peribronchiale und bronchioläre Ausbreitungsmuster. Im CT zeigt die PCP

---

eine schnellere Dichtezunahme mit zunehmender Traktion des Lungengerüsts und frühem Auftreten von fibrotischen Lungenparenchymveränderungen.<sup>131</sup>

#### **1.4.2.3.5 CMV-INFEKTIONEN DES GASTROINTESTINALTRAKTES**

##### **1.4.2.3.5.1 CMV-KOLITIS**

Kolitiden treten hauptsächlich bei AIDS-Patienten auf. Hier sind es 5-10%, die unter Diarrhö, Abdominalschmerzen, Gewichtsverlust, Anorexie und Fieber leiden. Die Differentialdiagnosen sind Infekte mit anderen gastrointestinalen Pathogenen, einschließlich *Mycobacterium avium*, *Kryptosporidien*, *Giardien*, *Entamoeben*, *Shigellen*, *Salmonellen*, *Campylobacter spp.* und die durch *Clostridium difficile* verursachte toxische Kolitis. Das Vorhandensein abdomineller Schmerzen könnte auch für eine Divertikulitis, einen intraabdominellen Abszess oder eine mesenterische Ischämie sprechen. Koloskopisch sind diffuse mukosale Ulzerationen zu sehen. Biopsien zeigen Vaskulitiden, neutrophile Infiltrationen und unspezifische Entzündungen. Werden die o.g. Pathogene in Routineabstrichen, Kulturen, Untersuchungen auf Ova und Parasiten oder den *C. difficile*-Toxin-Assay nicht nachgewiesen, sichern das Vorhandensein von CMV-Einschlüssen und/oder CMV-Antigen und/oder eine positive Kultur aus Biopsiematerial die Diagnose einer CMV-Kolitis. Komplikationen sind Perforationen des Kolons, Hämorrhagien oder Peritonitiden. Eine Therapie erfolgt mit Ganciclovir.<sup>132</sup>

##### **1.4.2.3.5.2 CMV-ÖSOPHAGITIS**

Eine klinisch evidente Ösophagitis ist bei Immunsupprimierten meistens durch *Candida albicans* oder *Herpes simplex* bedingt, aber eben auch durch CMV. Das Hauptsymptom, das bei 90% der betroffenen Patienten auftritt, ist eine Odynophagie (Schmerzen beim Schlucken). Eine Dysphagie (Schwierigkeiten, zu schlucken) tritt bei einem Drittel der Patienten auf. Bei allen Patienten sind Ulzerationen mit charakteristischen viralen Inklusionen zu beobachten. Soor tritt zeitgleich mit einer

---

CMV-Ösophagitis auf. Der Nachweis der Krankheit erfolgt endoskopisch mit anschließender Mikroskopie und Kultur. Die Therapie erfolgt mittels Ganciclovir.<sup>132</sup>

#### **1.4.2.3.5.3 CMV-GASTRITIS**

Eine Gastritis wird evident durch schwere, kontinuierliche epigastrische Schmerzen. Radiologisch oder gastrokopisch können gastrische Ulzera gesehen werden. Diagnostiziert wird eine CMV-Gastritis mittels Biopsie und den gleichen Techniken, die bei der CMV-Kolitis und CMV-Ösophagitis angewendet werden.<sup>132</sup>

#### **1.4.2.3.6 CMV-HEPATITIS**

Die CMV-Hepatitis tritt am häufigsten bei Empfängern einer Lebertransplantation auf. Warum bestimmte Erkrankungsformen des CMV bei bestimmten Patientenpopulationen auftreten, ist noch nicht völlig geklärt. Wahrscheinlich hängt es mit der unterschiedlichen Zusammensetzung gebildeter proinflammatorischer Zytokine zusammen.<sup>133</sup>

Von einer CMV-Hepatitis muss ausgegangen werden, wenn die Bilirubinwerte und/oder die Enzymwerte im Leberfunktionstest erhöht sind, es keinen Anhalt auf eine Hepatitis anderer Ursache gibt, und eine CMV-Infektion in einer Leberbiopsieprobe nachgewiesen wurde. Die Detektion von CMV mittels PCR ist insuffizient bei der Diagnose einer CMV-Hepatitis, da sie auch eine transiente Virämie anzeigen könnte. Eine Dokumentation vom CMV (z.B. mit einer immunhistochemischen Analyse) im Lebergewebe ist notwendig. Andere Pathogene, wie das Hepatitis-C-Virus können vorhanden sein, ohne CMV auszuschließen.<sup>134</sup>

#### **1.4.2.3.7 CMV-RETINITIS**

Bei immunsupprimierten Patienten kann eine hämatologische Dissemination einer Reaktivierung eines latenten CMV als auch exogen erworbene Stämme von CMV in einer Retinitis resultieren. Obwohl die *CMV-Retinitis* die häufigste klinische

Komplikation einer CMV-Reaktivierung bei HIV-infizierten Patienten ist, kommt sie bei HSCT-Empfängern weitaus seltener vor.<sup>135-138</sup> Der Grund für diese unterschiedliche Prävalenz in unterschiedlichem klinischen Umfeld ist noch unklar. Eine mögliche Erklärung könnte die große CMV-bezogene Mortalität nach Transplantation (z.B. in den ersten hundert Tagen) sein,<sup>139</sup> und der relative Mangel von Menschen mit Risiko für eine CMV-Reaktivierung, die eine prolongierte Langzeitimmunsuppression nach HSCT erhalten haben. Seit der Einführung der präemptiven Ganciclovir-Therapie früh nach Transplantation<sup>140</sup> überleben die meisten Patienten Episoden einer CMV-Infektion in den ersten drei Monaten nach Transplantation und ein spätes Auftreten einer CMV-Krankheit wird häufiger beobachtet.

Die *CMV-Retinitis* ist eine späte Komplikation nach HSCT. Der durchschnittliche Diagnosezeitpunkt liegt bei 251 Tagen. Sie tritt hauptsächlich bei Patienten mit vorangehender CMV-Reaktivierung oder -Krankheit in den ersten drei Monaten nach Transplantation auf. Außerdem entwickeln fast 90% der allogenen Patienten eine Retinitis im Rahmen einer chronischen klinisch-extensiven GvHD. Die gesamte Prävalenz einer *CMV-Retinitis* bei CMV-seropositiven Patienten mit chronischer klinisch-extensiver GvHD soll bei 1,4 % liegen, was diese Patientengruppe als Gruppe mit dem höchsten Risiko für eine *CMV-Retinitis* macht.<sup>141</sup>

Die *CMV-Retinitis* macht etwa 5% der späten CMV-assoziierten Erkrankungen aus. Dieses Risiko wird vielleicht unterschätzt aufgrund der Tatsache, dass sich eine *CMV-Retinitis* sehr langsam entwickelt; sie beginnt in der Peripherie der Retina und macht minimale visuelle Symptome. Ophthalmologische Untersuchungen dieser Komplikation sind nicht Teil der Standarduntersuchungen, die bei Patienten nach HSCT gemacht werden. Daher werden wahrscheinlich manche Fälle einer spontanen Remission, die begleitend mit der Immunrestitution auftreten, übersehen. Zusätzliche Fälle werden wahrscheinlich bei Patienten übersehen, die sterben und bei Patienten mit einer atypischen Präsentation einer Retinitis. Für solche Fälle sollten vielleicht neue Diagnosemethoden in Anspruch genommen werden, wie die PCR-Analyse des Kammerwassers<sup>142</sup> oder einer Probe des Glaskörpers.<sup>143</sup>

Dennoch haben fast alle Patienten klinische Symptome und die ophthalmologische Präsentation einer *CMV-Retinitis* ist charakteristisch.<sup>141</sup>

Die *CMV-Retinitis* nach HSCT spricht gut auf systemische Anti-CMV-Behandlung mit Ganciclovir, Foscarnet oder Cidofovor an.<sup>141</sup> Die Behandlung dauert meist zwischen sechs und achtzehn Wochen und ein Rezidiv tritt für gewöhnlich nicht auf.<sup>141</sup>

Lymphopenie scheint übrigens ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der *CMV-Retinitis* zu sein. Die *CMV-Retinitis* ist meist mit einem verspäteten Engraftment der Lymphozyten assoziiert.<sup>141</sup> Das stimmt mit der Tatsache überein, dass Lymphopenie generell ein wichtiger Risikofaktor für eine CMV-Krankheit<sup>144</sup> und einen schlechten Ausgang einer CMV-Infektion ist.<sup>145</sup>

Eine Retinitis entwickelt sich allerdings spät nachdem sich die Patienten von einer Lymphopenie erholt haben, die in prolongierte Perioden in den ersten hundert Tagen auftrat.<sup>141</sup> Zudem hat ein Großteil der Patienten mit CMV-Krankheit früh nach Transplantation kein Rezidiv ihrer Erkrankung an ihrem ursprünglichen Ort, wenn eine Retinitis diagnostiziert wird<sup>141</sup>

Bei Empfängern einer allogenen HSCT repräsentiert das Wiedererlangen der auf Major-Histokompatibilitäts-Komplex-I beschränkten CD8<sup>+</sup> CMV-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten die Effektoren der Anti-CMV-Aktivität;<sup>146</sup> und verleiht zudem Schutz gegen eine CMV-Pneumonie.<sup>147</sup> Es ist vorstellbar, dass das Repertoire an Klonen von CMV-spezifischen CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen und CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen, die sich während einer frühen CMV-Infektion im Vorhandensein einer Lymphopenie rekonstituiert haben, begrenzt ist und das Retinagewebe ein Gebiet latenter CMV-Infektion ist, das nicht leicht mit Überwachungsmechanismus des Immunsystems erkannt werden kann. Diese schwierige Wanderung der CD8<sup>+</sup> CMV-spezifischen Klone durch das vaskuläre Endothel des inneren Kompartiments des Auges wurde auch schon bei möglichen immunologischen Fluchtmechanismen, die die Immuneffektorzellen davor bewahren, das Auge zu erreichen, beschrieben.<sup>148</sup> Alternativ könnte das Auftreten einer Retinitis nach dem Abklingen einer Lymphopenie auch auf die Erholung der CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> CMV-spezifischen Klone, die auf eine subklinische CMV-Augeninfektion reagierten, zurückzuführen sein.<sup>149</sup> Die Evaluation der zugrunde liegenden Mechanismen der *CMV-Retinitis* in diesem Zusammenhang ist berechtigt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die *CMV-Retinitis* eine seltene Komplikation nach HSCT ist und hauptsächlich bei HSCT-Empfängern mit chronischer klinisch-extensiver GvHD auftritt, besonders bei Patienten mit CMV-

positiven Ergebnissen serologischer Untersuchungen vor Transplantation. Vorbestehende CMV-Infektion oder –Krankheit und verspätetes Engraftment der Lymphozyten sind wichtige Faktoren, die mit der Entwicklung dieser potentiellen sehbeeinträchtigenden Komplikation assoziiert werden können. Patienten mit diesen Charakteristiken sollten geraten werden, visuelle Symptome wie verschwommenes Sehen und entoptische Wahrnehmungen nicht zu ignorieren. Solche Patienten sollten sofort einem Ophthalmologen vorgestellt werden. Diese speziell okulare Lokalisation der CMV-Krankheit ist eine späte Komplikation nach HSCT; sie kann uni- als auch bilateral sein und reagiert gewöhnlich gut auf systemische Therapie.<sup>141</sup>

#### **1.4.2.3.8 ATYPISCHE MANIFESTATIONEN EINER CMV-KRANKHEIT**

Präemptive antivirale Therapie hat das Auftreten einer frühen Cytomegalovirus-Krankheit nach allogener Stammzelltransplantation reduziert, allerdings wird immer häufiger von der Entwicklung einer späten Krankheit mit schlechter Prognose berichtet.<sup>150-152</sup>

Eine späte Krankheit scheint eher mit atypischen Manifestationen wie Retinitis, Ventrikuloenzephalitis und Polyradikulopathie (PRP) assoziiert werden zu können, die vorher als für AIDS charakteristisch betrachtet wurden.<sup>151-153</sup> So wurde beispielsweise die *CMV-PRP* lange Zeit nur bei fortgeschrittener HIV-Infektion beschrieben, nicht nach HSCT.<sup>153</sup>

Eine CMV-Krankheit des ZNS wird am häufigsten bei fortgeschrittener HIV-Infektion diagnostiziert und sehr viel seltener, aber immerhin auch bei durch solide Organtransplantationen oder HSCT immunsupprimierten Patienten.<sup>154</sup> Verzögerte Immunrekonstitution mit konsistenten niedrigen CD4-Zahlen kombiniert mit Immunsuppression bei HSCT Empfängern macht eine hohe Virusreplikationsrate möglich.<sup>155</sup> Die hohe Replikationsrate in Kombination mit präemptiver antiviraler Therapie verzögert den Zurückgewinn der CMV-spezifischen T-Zell-Immunität.<sup>152, 156, 157</sup> Beide Mechanismen fördern wahrscheinlich die Entwicklung atypischer später CMV-Manifestationen. Fortgeschrittene Antigenämie und T-Lymphopenie sind starke Prädiktoren für eine späte CMV-Krankheit.<sup>157</sup>

Es gibt fünf charakteristische Kriterien einer *CMV-PRP*: Hyporeflexie, Schwäche der unteren Extremitäten, Parästhesien, verminderte Sensorik und Harnverhalt.<sup>153, 155</sup> Sowohl bei *CMV-PRP* bei AIDS-Patienten als auch Stammzelltransplantierten scheint bei 100% die durchschnittliche Überlebenszeit bei 13 Wochen zu liegen.<sup>153, 155</sup>

Eine *CMV-PRP* als eine atypische Manifestation einer CMV-Krankheit, die einer prolongierten präemptiven Therapie folgt, sollte im Hinterkopf behalten werden, wenn nach Pathogenen gesucht wird, die für neurologische Symptome bei Patienten nach HSCT verantwortlich sein könnten.

### **1.4.3 PATHOGENESE**

Pathogenetische Mechanismen, die beim Auftreten einer HCMV-Erkrankung bei Gewebe- und Organtransplantatempfängern eine Rolle spielen, sind einerseits Immunsuppression und fehlende Immunität und andererseits die Reaktivierung des latenten Virus.<sup>85</sup> Die Auslösung und Verstärkung einer Reaktivierung wird begünstigt durch Interaktion mit anderen Viren (z.B. HHV-6) oder eine vermehrte Synthese von Zytokinen („cytokine storm“) während bakterieller Infektionen, einer GVHD oder Behandlung mit antilymphozytären Antikörpern.<sup>85, 113</sup>

So sind neben dem Serostatus und der Art und Intensität der Immunsuppression auch interkurrente bakterielle Infektionen, Auftreten einer Hepatitis oder GvHD nach Stammzelltransplantation als Risikofaktoren zu betrachten.<sup>85, 113</sup>

Das Risiko für die Entwicklung einer HCMV-Erkrankung ist höher nach einer Lungentransplantation als beispielsweise nach Herz-/Leber- oder gar Nierentransplantation. Nach Transplantation solider Organe von CMV-seropositiven Spendern steht die Schädigung des transplantierten Organs wie die Pneumonie nach Lungentransplantation und die Hepatitis nach Lebertransplantation im Vordergrund. Bei Empfängern von allogenen Stammzelltransplantaten sind die häufigsten Manifestationen der HCMV-Erkrankung die HCMV-Pneumonie, gastrointestinale Ulzera, sowie die Retinitis.<sup>85</sup>

HCMV sind außerdem indirekte Effekte auf akute oder chronische Abstoßungsreaktionen zuzuschreiben. Aufgrund der durch HCMV ausgelösten Immunsuppression auch auf das Auftreten bakterieller Superinfektionen bzw.

opportunistischer Infektionen sowie Epstein-Barr-assoziierte lymphoproliferative Erkrankungen („posttransplantation lymphoproliferative disorders“ PT-LPD).<sup>113</sup>

HIV-infizierte Patienten erkranken nur selten im Rahmen einer primären Infektion. Meistens handelt es sich bei ihnen um eine Reaktivierung eines latenten Virus, da sie im Vorfeld nahezu alle seropositiv für HCMV waren. Eine Korrelation des Auftretens einer HCMV-Erkrankung ist eindeutig mit dem Schweregrad der Immunschwäche auszumachen. Besonders gefährdet sind Patienten mit einem Abfall der CD4-positiven T-Lymphozyten <50-100/μl. Die direkten zytotoxischen Wirkungen des HCMV-Virus führen bei HIV-Infizierten oft zu einseitig beginnender, später auch beidseitig auftretender HCMV-Retinitis, die zur Erblindung führen kann. Die „Highly Active Antiretroviral Therapy“ (HAART) mit Protease-Inhibitoren und Hemmstoffen der HIV-Reversen Transkriptase hat zu einer Abnahme der HCMV-Retinitiden geführt.

Allerdings wurde dafür das Auftreten intraokulärer Entzündungen beobachtet, die als Antwort des Immunsystems auf persistierende virale Proteine in HCMV-Läsionen der Retina betrachtet werden.<sup>158</sup> Andere Krankheitsmanifestationen sind selten.

Unter einer passageren Störung der zellulären Immunität leiden oft Patienten mit einer malignen Grunderkrankung, die einer (Poly-)Chemotherapie und/oder eine Bestrahlung erhalten. Dies führt jedoch meist nicht zu einer Erkrankung in Folge einer primären oder sekundären Infektion.<sup>159</sup>

#### **1.4.4 KLINISCHE RISIKOFAKTOREN**

Die Faktoren, die bekannt sind, den Ausgang einer Transplantation zu beeinflussen, sind HLA-Disparität<sup>160-164</sup>, T-Zell-Depletion,<sup>165-168</sup> der CMV-Serostatus von Empfänger und Spender<sup>163, 165-170</sup>, GvHD<sup>165-168</sup>, Alter des Patienten, Krankheitsgrad zum Zeitpunkt der Transplantation<sup>171, 172</sup>, Zelldosis<sup>170, 172, 173</sup> und die dosisreduzierte Behandlung.<sup>174-178</sup>

#### **1.4.4.1 HLA-DISPARITÄT**

Eine Knochenmarkstransplantation vom unverwandten Spender ist eine akzeptierte Behandlung von Patienten mit einer Vielzahl hämatologischer Krankheiten, Syndromen mit Knochenmarkversagen, Immunschwächen und metabolischen Störungen ohne HLA-identischen Familienspender.<sup>160, 179-181</sup> Im *International Registry Network* sind mehr als fünf Millionen HLA-typisierte Freiwillige verzeichnet, was eine 75%-ige Wahrscheinlichkeit bedeutet, einen HLA-A, -B oder -DR passenden Spender zu finden. Trotzdem ist eine BMT vom unverwandten Spender mit einer hohen Inzidenz einer akuten und chronischen GvHD, Transplantatversagen und infektiösen Komplikationen assoziiert.<sup>161, 171</sup> Durch die Abstimmung von Spendern und Empfängern durch die genomische Typisierung der HLA-Klasse II-Antigene, hat sich die Inzidenz der GvHD verringert im Vergleich zu alleiniger serologischer Typisierung.<sup>182</sup> Die Verwendung von T-Zell-depletiertem Knochenmark bei einer Transplantation vom unverwandten Spender resultierte in einer geringeren Inzidenz einer schweren GvHD, aber in einer höheren Rate von Transplantatversagen.<sup>161</sup>

*In vivo* T-Zell-Depletion kann erreicht werden durch eine Therapie vor der Transplantation mit Anti-CD25 Antikörpern oder Anti-Thymozyten-Globulin (ATG).<sup>183-185</sup> Es wurde gezeigt, dass ATG als Teil einer vorbereitenden Maßnahme bei Stammzelltransplantation vom unverwandten Spender das Risiko einer schweren akuten und chronischen GvHD und Transplantatversagen ohne erhöhtes Risiko eines Rezidivs reduziert.<sup>163</sup>

#### **1.4.4.2 T-ZELL-DEPLETION**

T-Zell-Depletion (TCD) des Transplantats, was die effektivste Methode für die Prävention einer GvHD darstellt, ist nachgewiesenermaßen ein wichtiger Risikofaktor für eine CMV-Reaktivierung und eine CMV-Krankheit. Das Wiedererlangen der CMV-spezifischen T-Zell-vermittelten Immunität nach Stammzelltransplantation ist ein kritischer Punkt im Schutz gegen die CMV-Krankheit.<sup>186</sup> Ein besseres Verständnis der Kinetik der Rekonstitution von spezifischen T-Zellen hat die Wichtigkeit der CMV-

spezifischen Immunität bei der Vorbeugung einer CMV-Reaktivierung und ihrem Fortschreiten verdeutlicht. <sup>102, 104, 105</sup>

Der Schutz gegen CMV steht in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit der Erholung der CMV-spezifischen T-Zell-Immunität, sowohl der CD4+ als auch CD8+ Populationen. <sup>102, 104, 105, 186</sup> Diese ist generell verzögert bei TCD Transplantatempfängern im Vergleich zu denen, die unmanipulierte Transplantate erhalten, was der wahrscheinlichste Grund für den Anstieg der CMV-Infektionen ist. Trotzdem ist das Schema einer CMV-Infektion nach TCD nicht vorhersagbar und hängt ab von der Methode und dem Ausmaß der TCD. <sup>187</sup>

Man weiß übrigens, dass CMV-positive Menschen signifikante Mengen an CMV-spezifischen T-Zellen in peripherem Blut besitzen, bis zu 40% werden beschrieben. <sup>3</sup> Dieses Wissen macht die CMV-Seropositivität relevant für T-Zell-depletierte allogene Transplantationen. <sup>188-190</sup>

#### **1.4.4.3 SEROSTATUS**

*Der CMV-IgG-Serostatus vor Transplantation* ist ein bedeutender Risikofaktor bei Stammzelltransplantationen vom unverwandten Spender hinsichtlich dem Gesamt- und krankheitsfreien Überleben als auch der behandlungsbezogenen Mortalität (TRM). <sup>169, 171</sup> In Bezug auf Overall and krankheitsfreiem Überleben hat CMV-Seropositivität den stärksten prädiktiven Wert, gefolgt von Alter, spätem Engraftment (>20 Tage) und dem Risikostatus der Krankheit vor der Transplantation. CMV-Positivität beeinflusst nachhaltig TRM, gefolgt von Alter und Leukozyten-Engraftment.

Die CMV-Krankheit vor Transplantation beeinflusst den Ausgang der Transplantation nicht durch die CMV-Krankheit direkt, sondern eher durch die Erhöhung der Inzidenz einer akuten GvHD. <sup>191</sup>

Bei Stammzelltransplantation mit *sowohl Spender als auch Empfänger CMV-Serumpositivität* erholten sich die CMV-spezifischen CTL schnell und erreichen bis zu 21% aller CD8+-T-Zellen. <sup>192</sup> Eine frühe Rekonstitution wird nicht beobachtet, wenn *Spender oder Empfänger seronegativ* sind. Hier werden in den ersten 100

Tagen nach Transplantation keine CMV-spezifischen CTLs (Cytotoxic T lymphocytes) gesehen. Der erneute Anstieg der CTL ist bei Empfängern eines Transplantats vom unverwandten Spender auch langsamer als bei Empfängern eines verwandten Transplantats.<sup>192</sup> Die CTLs nahmen nach Episoden einer CMV-Reaktivierung zu und wurden durch Prednisolon-Therapie gedrückt.<sup>193</sup>

In der Gruppe der seropositiven Patienten haben diejenigen mit ebenfalls positivem Spender ein besseres Gesamtüberleben als diejenigen mit negativem Spender und zudem eine niedrigere Frequenz einer CMV-Reaktivierung durch positive pp65-Antigenämie. Bei Stammzelltransplantationen bei seropositiven Empfängern vom unverwandten Spender scheint ein seropositiver Spender auch geeigneter zu sein als ein seronegativer Spender. Dies ist auch aus der Studie von *Boland et al* zu ersehen,<sup>194</sup> der zudem berichtet, dass bei CMV-seropositiven Patienten mit einem seropositiven Spender eine frühere Lymphozytenproliferation als Antwort auf CMV auftritt als bei CMV-positiven Patienten mit seronegativem Spender.

Die TRM ist bei CMV-seropositiven Patienten etwa dreimal so hoch als bei seronegativen.<sup>92</sup> Seronegative Empfänger sollen unabhängig vom Serostatus des Spenders weniger gefährdet sein.<sup>195</sup>

Die Tatsache, dass die Mortalitätsrate bei CMV-positiven Patienten ohne Reaktivierung genauso hoch ist wie bei Patienten mit Reaktivierung, lässt vermuten, dass die CMV-Seropositivität ein unabhängiger Risikofaktor für TRM ist. Dies lässt sich damit erklären, dass die Mortalität von CMV-seropositiven Patienten mit Reaktivierung hauptsächlich durch das Auftreten CMV-assoziiierter Erkrankungen zustande kommt und nach einem Median von 112 Tagen nach Transplantation auftritt. Die hohe Mortalitätsrate bei CMV-positiven Patienten ohne Reaktivierung ist meistens auf die Toxizität zurückzuführen, wie z.B. VOD, Sepsis, Blutungen, alveoläre Hämorrhagien oder Pilzinfektionen und hat ihren Häufigkeitsgipfel früher in der Posttransplantationsphase (Median 64 Tage).<sup>196</sup>

#### 1.4.4.4 GVHD

Eine erhöhte Anfälligkeit für opportunistische Infektionen und anschließende TRM können aus einer erhöhten Inzidenz von GvHD resultieren.<sup>197-202</sup>

CMV-seropositive Patienten haben eine signifikant höhere Inzidenz einer akuten GvHD. Das hängt damit zusammen, dass eine GvHD selbst immunsuppressiv wirkt und die immunsuppressiven Medikamente zur Behandlung der GvHD noch mehr Immunsuppression zur Folge haben. CMV spielt wahrscheinlich auch eine Rolle bei der Entwicklung einer GvHD. Mehrere Studien haben bereits belegt, dass es eine Assoziation zwischen einer Seropositivität und der Wahrscheinlichkeit, eine GvHD nach Transplantation zu entwickeln, gibt.<sup>197-202</sup> Im Experiment mit Mäusen CMV-Infektion wurde die Fähigkeit von parentalen Zellen der Milz positiv beeinflusst, eine GvHD zu entwickeln.<sup>203</sup> Zudem kann latenter humaner CMV in vielen Organen wie der Leber, der Milz und dem Endothelium gefunden werden.<sup>204</sup> Es wurde gezeigt, dass CMV-infizierte endotheliale Zellen inflammatorische Zytokine wie das Interleukin-6, das die Leukozytenadhäsion bewirkt, bilden, die wahrscheinlich eine Rolle in den initialen Phasen beim Beginn einer Graft-versus-Host Reaktion spielen.<sup>205</sup> *Lichtman et al* haben gezeigt, dass Interleukine wie das Interleukin-1, der Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin-6 eine eigene Rolle in der initialen Phase der T-Zell-Aktivierung spielen, und zwar bevor die T-Zellen durch Empfänger-Alloantigene spezifisch aktiviert werden.<sup>206</sup> Die inflammatorische Antwort, die durch CMV im Endothelium des Empfängers hervorgerufen wird, kann daher zu dem Auftreten einer GvHD beitragen.

Es ist erwiesen, dass die Entwicklung einer akuten GvHD signifikant das Risiko einer TRM und reduziertem Gesamtüberleben erhöht. Diese Erkenntnisse belegen, dass die nachteiligen Effekte einer CMV-Seropositivität über eine vergrößerte Inzidenz einer akuten GvHD und eine anschließende erhöhte TRM vermittelt werden.

Insbesondere die mit einer GvHD zusammen hängende *Steroidbehandlung* begünstigt auch die Reaktivierung des CMV-Virus.<sup>207</sup>

Nach nonmyeloablativer Transplantation ist das Auftreten einer akuten GvHD im Vergleich zu einer myeloablativen Transplantation signifikant verzögert.<sup>208</sup> Dies lässt darauf schließen, dass durch die Verwendung von CsA/MMF im Kontext der dosisreduzierten Transplantation, T-Zell-vermittelte Alloreaktionen wie die GvHD

verspätet auftreten und auf der anderen Seite diese mehr immunsuppressive als myeloablative Methode den Patienten einem höheren und prolongierten Risiko für mindestens CMV-Infektionen aussetzen.

Die Rolle der Immunsuppression nach Transplantation und ihre Wirkungen auf B-, T- und/oder dendritische Zellen, sowie die Rolle des Grads des Post-transplant-Chimerismus, bei transplantationsbezogenen Infektionen wie die GvHD und Infektionen bleibt bestimmend.<sup>207</sup>

#### **1.4.4.5 DOSISREDUZIERTE BEHANDLUNG**

Eine intensitätsreduzierte Behandlung ist eine zunehmend durchgeführte Behandlungsoption bei Patienten mit einer Indikation zur Stammzelltransplantation, aber Kontraindikationen gegen eine myeloablative Behandlung. Die Kombination von Busulfan, Fludarabin und ATG wurde als nonmyeloablatives Behandlungsprotokoll bei allogenen HSCT 1998 eingeführt.<sup>210</sup> Durch eine intensitätsreduzierte Behandlung soll eine frühe Mortalität durch Infektionen vermindert werden.<sup>210, 211</sup> Dieser Effekt wird dadurch erklärt, dass es zu einer kürzeren Phase der Zytopenie und weniger Organschäden aufgrund reduzierter toxischer Agenzien kommt. In der Studie von *Schetelig et al*<sup>178</sup> war die TRM an Tag+100 nach Transplantation geringer (5 vs 30%, P=0,002) nach intensitätsreduzierter Konditionierung verglichen mit myeloablativer Behandlung; Ähnliches berichtet *Slavin et al*.<sup>210</sup>

So wirkt sich die hohe Inzidenz von CMV-Infektionen nach intensitätsreduzierter Konditionierung nicht auf eine hohe TRM-Rate an Tag+100 nach Transplantation aus. Bei myeloablativer Behandlung soll die CMV-Antigenämie aber die TRM an Tag+100 vorhersagen können. Es ist anzunehmen, dass in dieser Gruppe die Kombination von Organschäden verursacht durch Myeloablation, signifikant längere Perioden von Zytopenie, akuter GvHD und Nebenwirkungen von Ganciclovir zerstörerische Konsequenzen haben – trotz erfolgreicher Therapie einer CMV-Infektion.

Trotzdem wurden in mehreren Studien von einer erhöhten Inzidenz von CMV-Infektionen nach intensitätsreduzierter Konditionierung, die T-Zell-depletierende Agenzien enthalten, berichtet.<sup>174, 175, 178</sup> Die 1-Jahres-Nonrelapse- Mortalität, die

größtenteils auf späte Infektionen aufgrund akuter und chronischer GvHD zurückzuführen ist, soll 30% bei Hochrisikopatienten betragen.<sup>177</sup>

*Nachbaur et al* belegen mit ihrer Studie<sup>207</sup>, dass für eine CMV-Infektion nach einer *dosisreduzierten nonmyeloablativen Stammzelltransplantation*, die hauptsächlich bei älteren und sehr jungen Patienten mit signifikanter Komorbidität und daher eben einer Uneignung für eine konventionelles myeloablatives Allografting eingesetzt wird, ein Trend zur erhöhten Inzidenz einer CMV-Infektion besteht.<sup>207</sup> Die *Therapie mit Anti-T-Zell-Antikörpern* als Teil der dosisreduzierten Behandlung soll möglicherweise einen schädlichen Einfluss auf die Immunrestitution haben.<sup>208</sup> Auf ähnliche Weise bewirkte in deren Studie der *Erhalt von Transplantaten nach In vivo T-Zell-Depletion* mit Thymoglobulin®, die einer intensitätsreduzierten Behandlung folgte, eine Erhöhung der kumulativen Inzidenz, bei Transplantaten vom unverwandten Spender sogar auf 75%.<sup>207</sup> Generell erhöht die Verwendung von T-Zell-depletierenden Agenzien das Risiko eines verspäteten Wiedererlangens der CMV-Immunität.

Ein weiteres T-Zell-depletierendes Agenz ist *Alemtuzumab*, das immer häufiger bei intensitätsreduzierter Konditionierung angewendet wird. *Chakrabarti et al*<sup>174</sup> berichteten von einer hohen Insidenz von CMV-Infektionen nach Alemtuzumab-enthaltenden intensitätsreduzierten Konditionierung. CMV-Infektionen wurden mittels PCR bei 85% der seropositiven Patienten entdeckt und bei 71% der Patienten, die an wiederkehrenden Infektionen litten. *Pérez-Simón et al* verglichen retrospektiv die Inzidenz von GvHD zwischen zwei prospektiven Studien über intensitätsreduzierter Konditionierung in Großbritannien und Spanien.<sup>214</sup> Beide Studiengruppen verwendeten die Kombination von Fludarabin und Melphalan, aber in Großbritannien bestand die GvHD-Prophylaxe aus CsA und Alemtuzumab vor der Transplantation, während in Spanien CsA mit MTX nach Transplantation kombiniert wurde. Sie konnten demonstrieren, dass trotz geringerer Inzidenz von akuter GvHD bei Patienten, die Alemtuzumab erhielten, die Inzidenz von CMV-Infektionen höher war nach Behandlung mit Alemtuzumab verglichen mit MTX (47 vs 22,7%, P=0,018) Bei den Patienten, die Alemtuzumab erhielten, basierten die Diagnosen auf PCR-Assays, wohingegen bei den anderen Patienten auf CMV-Antigenämie. Diese Verwendung verschiedener Techniken könnte das Ergebnis beeinflusst haben.

Dass das Risiko bei dosisreduzierten Transplantationen generell höher ist, hängt sicherlich auch damit zusammen, dass sie im Allgemeinen bei älteren Patienten durchgeführt werden. Und *Alter* ist eben zusätzlich ein bekannter Risikofaktor für CMV-Infektionen.

Es ist wahrscheinlich, dass die Immunsuppression bei einer nonmyeloablativen Behandlung und die Strategie der Immunsuppression nach Transplantation einen signifikanten Einfluss auf das Risiko einer Infektion haben.

Es gibt auch gegenteilige Beobachtungen von z.B. *Junghans et al*<sup>212</sup>, wonach es einen Trend zu einer weniger ausgeprägten und verzögerten CMV-Antigenämie und Virämie nach myeloablativen Transplantationen geben soll. *Junghans et al* stellten die Hypothese auf, dass persistierende immunkompetente Zellen des Wirts gegen frühe CMV-Infektionen schützen.

Ein möglicher Grund für diese unterschiedlichen Beobachtungen könnte sein, dass Fludarabin, Busulfan und ATG signifikant hämatotoxisch sind und bekanntermaßen einen gesamten Spenderchimerismus innerhalb eines Monats induziert, wohingegen die 200cGy TBI (Total Body Irradiation) -basierte Behandlung wirklich nonmyeloablativ ist und einen gemischten Chimerismus für eine Periode von drei Monaten möglich macht.<sup>177, 213</sup> Deswegen persistierten in der Studie von *Schetelig et al* wahrscheinlich auch nicht genügend immunkompetente Zellen.

*Martino et al*<sup>214</sup> berichten von einer niedrigen Inzidenz von CMV-Infektionen bei Patienten nach intensitätsreduzierter Konditionierung, allerdings ohne die Verwendung von ATG. Die Inzidenz von CMV-Infektionen bei Patienten mit mäßigem bis hohem Risiko einer Reaktivierung war niedriger nach intensitätsreduzierter verglichen mit myeloablativer Konditionierung. Daher kann ATG wahrscheinlich für die hohe Inzidenz von CMV-Infektionen verantwortlich gemacht werden.<sup>215</sup> Ein Grund für diese Beobachtung könnte sein, dass ATG zwar die Immunsuppression des Patienten erhöht, die Häufigkeit und Schwere einer GvHD aber reduziert, was sich wiederum positiv auf die Abwehr einer CMV-Infektion auswirkt.

Es wurde auch schon beobachtet, dass die Behandlungsmethode keinen Einfluss auf das Auftreten einer Infektion hatte. Es soll auch kein signifikanter Unterschied in der 1-Jahres-Wahrscheinlichkeit einer Virämie zwischen den beiden Gruppen, also

intensitätsreduzierter verglichen mit myeloablativer Konditionierung gegeben haben.  
178

Zusammenfassend ist zu sagen, dass das tatsächliche Risiko einer CMV-Erkrankung durch eine dosisreduzierte Behandlung von mehreren Seiten zu beleuchten ist. Bei Patienten, die fast ausschließlich ATG als GvHD-Prophylaxe erhalten, hängt die Inzidenz der CMV-Infektionen auch immer noch am stärksten vom Serostatus des Spenders und Empfängers und dem Auftreten einer akuten GvHD ab, während die Dosisintensität des Behandlungsprotokolls weniger wichtig ist. Seronegative Patienten mit einem seropositiven Spender haben ein weitaus geringeres Risiko für eine CMV-Infektion als seropositive Patienten.<sup>178</sup> CMV-Antigenämie bleibt allerdings eine häufige Komplikation nach intensitätsreduzierter Konditionierung mit Busulfan, Fludarabin und ATG bei allogenen HSCT, ganz besonders bei seropositiven Patienten, die an einer GvHD leiden.<sup>178</sup>

### **1.4.5 DIAGNOSE**

Es stehen zurzeit verschiedene serologische, virologische und Nukleinsäure-Nachweismethoden zur Verfügung, die je nach Fragestellung eingesetzt werden können.

#### **1.4.5.1 FESTSTELLUNG DES INFEKTIONSSTATUS**

Der Infektionsstatus wird *indirekt* durch den Nachweis von HCMV-spezifischen *IgG-Antikörpern* im Serum festgestellt. Dafür stehen sowohl *ELISA*, Immunfluoreszenzteste, Immunoblot, Komplement-Bindungs-Reaktion als auch der Latexagglutinationstest zur Verfügung.

#### **1.4.5.2 NACHWEIS EINER PRIMÄRINFEKTION**

Der Nachweis einer Primärinfektion erfolgt *indirekt* serologisch über den *IgG-Titeranstieg*, gemessen in zwei kurzfristig genommenen (10-14 Tage im Abstand von ca. 2 Wochen) Serumproben bzw. über den Nachweis von HCMV-spezifischem *IgM*.

Vor der Serokonversion kann der Virus durch Virusisolierung (z.B. in Kurzzeitkulturen mit Antigennachweis in infizierten Zellen) oder durch Antigennachweis in Blutzellen, Geweben, Urin und Speichel erfolgen. Manchmal kommen auch *Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT)* zum Einsatz. Ein direkter Nachweis einer Virusinfektion vor Serokonversion kann jedoch nur über den Antigen-Nachweis in Leukozyten (*pp65*), mittels *Virusisolierung* oder *nested-PCR* erfolgen.

Bei Patienten nach Stammzelltransplantation geht man davon aus, dass sie nachweislich CMV-positiv/erkrankt sind, wenn sich deren *Antikörperspiegel* über Monate hin nicht verändert. Der Grund dafür ist, dass die Immunantwort dieser Patienten starken Schwankungen unterliegt und es aufgrund des Immundefekts zu einer eher inkonstanten Antikörperbildung kommt.<sup>216</sup> Außerdem haben Immunsupprimierte wie auch evtl. Säuglinge ein verzögertes Einsetzen der spezifischen IgM-Antikörperbildung.

#### **1.4.5.3 NACHWEIS EINER REAKTIVIERUNG**

Die Reaktivierung oder Sekundärinfektion kann serologisch durch Nachweis eines signifikanten Titeranstiegs HCMV-spezifischer *Antikörper* festgestellt werden. Bei Transplantationspatienten kann der Nachweis einer zweiten Erkrankungsepisode unter Umständen auf diesem Wege nicht mehr erfolgen, da die Antikörperproduktion und der Antikörperabfall wie oben bereits erwähnt mitunter starken Schwankungen unterworfen sind. Außerdem wird der Nachweis durch passiv übertragene Antikörper mittels Transfusion und Immunglobuline erschwert.

Daher erfolgt zum Monitoring der Reaktivierung der quantitative Nachweis von *pp65-Antigenen* in Leukozyten oder der quantitative Nachweis von *HCMV-DNA-Nachweis* aus Leukozyten oder Plasma. Bei einer HCMV-Enzephalitis kann entsprechende DNA auch im Liquor nachgewiesen werden.

#### **1.4.5.4 VIRUS-ANTIGENNACHWEIS**

##### **1.4.5.4.1 KURZ-ZEIT-KULTUR**

Die Kurz-Zeit-Kultur hat gegenüber der konventionellen Virusisolierung eine wesentlich kürzere Kulturzeit, außerdem hat er die gleiche Sensitivität wie der Antigenämietest. Hier werden Virusisolierung und CMV-Antigennachweis aus peripheren Blutleukozyten oder Urin kombiniert. <sup>217</sup>

##### **1.4.5.4.2 PP65-NACHWEIS**

###### **1.4.5.4.2.1 PP65-NACHWEIS MITTELS ANTIGENÄMIETEST**

Der pp65-Nachweis ist in der Transplantationsmedizin derzeit der „Goldstandard“ zur Früherkennung einer CMV-Replikation. Mittels Antigenämietest wird eine frühzeitige und sichere Diagnose ermöglicht. CMV-Antigene können lange vor dem Auftreten klinischer Symptome detektiert werden. Der Antigentest korreliert gut mit einer CMV-Erkrankung. Aufgrund der guten Quantifizierung ist der Test zudem auch gut zu Verlaufskontrollen geeignet.

Das Phosphoprotein (lower matrix protein) pp65 gehört zu den Early-Proteinen, wird im Rahmen der Virusinfektion früh gebildet und ist für die nachfolgende Virusvermehrung verantwortlich. Es ist wahrscheinlich das wichtigste Zielantigen für die zytotoxischen T-Lymphozyten. <sup>218</sup>

Er ist ein Parameter von großer diagnostischer Bedeutung, da sein Auftreten als früher Marker einer Virusinfektion gut mit der klinischen Manifestation und der Intensität einer Erkrankung korreliert. <sup>219</sup> Nach Phagozytose der viralen Proteine kommt es zu einer mit Leukozyten assoziierten Virämie. So lässt sich pp65 auf einem Blutzellenausstrich relativ einfach darstellen.

Die Strukturantigene in isolierten, peripheren, polymorphkernigen Leukozyten lassen sich mittels indirekter Immunfluoreszenz schnell und sensitiv nachweisen. Obwohl

Heparin- und Citratblut als Antikoagulanzen äquivalent zu sein scheinen, wird häufiger Heparinblut verwendet.<sup>219</sup>

Die Bindung der monoklonalen Antikörper erfolgt an das phagozytierte CMV-pp65-Antigen, welches sich in fixierten Blutaussstrichen präsentiert.<sup>220</sup> Durch Waschen werden die ungebundenen Antikörper entfernt. Fluorescein-isothiocyanat-(FITC)-konjugierte Antikörper binden sich allerdings an die Antigen-Antikörper-Komplexe. Durch eine zweite Waschung werden die ungebundenen Konjugate entfernt. Auf diese Art treten weniger Artefakte auf, die die Beurteilung negativ beeinflussen könnten. Nun folgt eine Auswertung im Fluoreszenzmikroskop von 100.000 – 200.000 Zellen, < 50.000 Zellen werden als unzureichend erachtet. Infizierte Zellen zeigen eine apfelgrüne Fluoreszenz im Zellkern, nicht infizierte Zellen haben durch die Gegenfärbung mit Evans-Blau einen dunkelrot abgesetzten Kern mit rötlich gefärbtem Plasma. Die Diagnose wird gesichert durch eine Quantifizierung und eine Beurteilung der Qualität der isolierten Leukozyten. Ein positives Testergebnis bedingt allerdings schon eine einzige positive Zelle.<sup>221</sup>

#### **1.4.5.4.2 PP65-NACHWEIS MITTELS FACS-ANALYSE**

Der Vorteil der FACS-Analyse zum pp65-Antigenämie-Test ist der sehr viel geringere Arbeits-, Zeit- und Personalaufwand, was auch eine „Notfallbestimmung“ ermöglicht. Die Analyse ist zudem objektiv und vom Untersucher unabhängig (keine subjektive visuelle Auswertung). Gegenüber der konventionellen Methode, die 8 ml Blut benötigt, werden nur 500 µl benötigt, was auch den Einsatz bei Früh- und Neugeborenen möglich macht. Zuletzt besteht noch die Möglichkeit der Differenzierung von Leukozyten-Subklassen, in denen pp65 nachgewiesen werden kann. Auf diesem Weg sind möglicherweise Aussagen von prädiktivem Wert möglich.

Bei der FACS-Analyse („fluorescence activated cell sorting“) oder Durchflusszytometrie werden Einzelzellen, hauptsächlich Leukozyten, auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften analysiert. Die Sortierung der Zellen erfolgt nach Oberflächenmolekülen bzw. –markern oder über ihre Expressionsdichte. Beim Vorgang der sog. hydrodynamischen Fokussierung werden die Zellen in einer FACS-Trägerflüssigkeit stark beschleunigt (500 – 4000 Zellen pro

Sekunde) und erscheinen so vereinzelt in der Messkammer, wo sie am Messpunkt fokussiert werden. Die Bestimmung der relativen Größe und Zellgranularität von Einzellzellen erfolgt durch die gleichzeitige Messung des Vorwärts- und des 90° Seitwärtsstreulichtes. Größe und Granularität korrelieren dabei direkt mit der Lichtintensität. Gemessen wird der relative „Lichtverlust“. Die zu untersuchenden Zellen werden zunächst mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Primär- oder Sekundärantikörpern markiert. Dann werden die Fluoreszenzfarbstoffe mit einem Argon-Laser, der Licht einer Wellenlänge von 488 nm generiert, angeregt. Die Messung des emittierten Lichts erfolgt über ein optisches System. Die Zellen werden je nach Expression der Oberflächenantigene und daraus folgender Intensität der Fluoreszenz in einen Messbereich von 1024 Kanälen eingeteilt. Die Auswertung erfolgt über das Punkt-Wolkendiagramm bzw. Histogramm, auch „dot plot“ genannt. Eine genauere Analyse wird durch die Einteilung in unterschiedliche Populationen mittels „Gates“, sog. Analysefenstern ermöglicht.

#### **1.4.5.5 VIRUS-GENOMNACHWEIS MITTELS PCR**

##### **1.4.5.5.1 GENAMPLIFIKATION**

Dieses Nachweisverfahren ist sehr sensitiv und es eignet sich gut zur Ausschlussdiagnostik einer CMV-Erkrankung aus Biopsiematerialien, Liquor oder respiratorischen Sekreten. Der positiv klinische prädiktive Wert ist bei seropositiven Patienten allerdings gerade aufgrund der hohen Sensitivität gering.<sup>221</sup> Die Persistenz der Marker ist sehr lang, daher ist der Test für die Therapiekontrolle oder bei Patienten mit häufigen Reaktivierungen nur mit Quantifizierung der Genomkopienzahl geeignet, wobei die Zahl der isolierten Zellen in die Berechnung mit eingehen muss.

Selbst niedrigste Konzentrationen von Virus-DNA bzw. RNA lassen sich mit dieser Technik aus nahezu allen Materialien mit hoher Spezifität nachweisen. Das Grundprinzip ist die Vervielfältigung bestimmter virusspezifischer DNA/RNA-

Sequenzen bis zu einer Anzahl von Kopien, anhand derer man den Virus nachweisen kann.

Die einzelnen Schritte des PCR-Zyklus werden im Kapitel Materialien und Methoden eingehender behandelt.

Bereits mehrere Wochen vor der klinischen Symptomatik können PCR-Ergebnisse positiv auffallen. Allerdings kann mittels DNA-PCR nicht zwischen latenter oder produktiver, lytischer Infektion unterschieden werden, da sich anhand der Ergebnisse keine Rückschlüsse auf die pathogenetische Rolle des Virus ziehen lassen. So kann das virale Genom in einer Zelle enthalten sein ohne Auslöser einer Erkrankung zu sein.

Die *NASBA-Technik* (Nucleic-Acid-Sequence-Based-Amplification) weist direkt virale transkriptionale Aktivität nach und wird im Ergebnis früher positiv als DNA-Teste oder die Antigenämieteste. Dafür ist sie sehr aufwendig und soll in der Klinik keinen Vorteil bringen.<sup>221</sup> Die tragende Rolle spielt die CMV-pp67-RNA. Bei dieser isothermen Amplifikation von Nukleinsäuren wird die virale RNA-Matrize in copy-DNA umgeschrieben und an ihr der komplementäre Gegenstrang gebildet. Dabei wird der T7-Promoter nach dessen Einbau durch einen ersten Primer neu synthetisiert. Die T7-Polymerase bindet dann an den T7-Promoter und synthetisiert ca. 100 neue RNA-Moleküle pro Strang. Dann beginnt der Reaktionszyklus erneut.

#### **1.4.5.5.2 SIGNALAMPLIFIKATION**

Dieser Test wird zur Kontrolle und Überwachung von Risikopatienten eingesetzt, da er aufgrund seiner geringen Sensitivität weniger die latenten, als die produktiven Formen der CMV-Infektionen erfasst. Es besteht eine gute Korrelation mit dem Auftreten klinischer Symptome. Dieses Nachweisverfahren ist enzymabhängig, was ihn gegenüber der PCR auszeichnet, allerdings ist es auch recht zeitaufwendig, zeigt einen schlechten Automatisierungsgrad und ist nur mit EDTA-Blut als Untersuchungsmaterial evaluiert. Außerdem ist sein Einsatz aufgrund seiner engen Materialauswahl manchmal schwierig.

Der Nachweis des Virusgenoms erfolgt bei der Virusamplifikation nach Hybridisierung mittels diverser Detektionsreaktionen. Der Amplifikationsschritt findet auf der Ebene der Nachweisreaktion statt. Beim *Hybrid-Capture-Test (HCT)* erfolgt nach der Denaturierung die Markierung mit einer RNA-Gensonde der viralen, aus Leukozyten gewonnenen DNA. Im Anschluss daran werden die entstandenen DNA-RNA-Hybride an eine feste Phase (Captureröhrchen) gebunden, wo sie von lumineszenzmarkierten Antikörpern nachgewiesen werden. Ein Luminometer misst dann die emittierten Signale in Form relativer Lichteinheiten. Die Quantifizierung der Proben erfolgt mittels einer Eichkurve.

#### **1.4.5.6 VIRUSANZUCHT IN ZELLKULTUREN**

Die Virusanzucht in Zellkulturen hat Bedeutung in der Gewinnung von Isolaten zur Resistenztestung. Zur direkten Diagnosestellung ist dieses Nachweisverfahren eher weniger geeignet, da sie wenig sensitiv ist und eine lange Kulturdauer hat.<sup>222</sup>

Untersuchungsmaterialien sind hauptsächlich respiratorische Sekrete oder Urin, die besonders empfänglich für CMV sind, prinzipiell können aber nahezu alle Untersuchungsmaterialien verwendet werden. CMV wächst nur auf humanen Zellen und die zytopathischen Effekte entwickelt es im Gegensatz zu Herpes simplex erst recht spät und ist abhängig von der Viruskonzentration im Ausgangsmaterial.

Beachtenswert ist, dass eine Virusausscheidung in Urin oder Speichel nicht unbedingt mit einer klinischen Erkrankung korrelieren muss. Darüber kann die Sensitivität dieses Verfahrens durch eine Vielzahl von Faktoren wie Kontaminationen und Transport beeinträchtigt werden.

#### **1.4.5.7 HISTOPATHOLOGISCHE NACHWEISE**

Histopathologische Untersuchungen können CMV-Infektionen betroffener Organe beweisen oder bestätigen, erfordern aber invasive Techniken und sind daher zu einer Therapieindikation, zur Unterstützung einer präemptiven Therapie oder zum Monitoring weniger geeignet.

Der Virusnachweis erfolgt anhand der Feststellung CMV-spezifischer *Gewebsveränderungen* in z.B. Geweben aus Lunge, Leber, Niere oder Gehirn. In den hämatoxylin- und eosin gefärbten Schnitten können vergrößerte, irregulär geformte Endothelzellen gesehen werden, die z.T. intranukleäre prominente Einschlüsse enthalten („*Cowdry type A*“) und auch „Eulenaugenzellen“ genannt werden. Es wurden allerdings auch zytopathische Veränderungen an Zellen ohne die charakteristischen Einschlüsse beobachtet.

Bei der *indirekten Immunhistochemie* wird über eine Färbung schnell und sensitiv mittels spezifischer, monoklonaler Antikörper nukleäres CMV-Antigen in Paraffinfixierten Geweben lokalisiert.

Zur *In-situ*-Hybridisierung in Geweben kann ggf. auch eine Färbung mit markierten DNA-Sonden zum Einsatz kommen.

#### **1.4.5.8 DIAGNOSTIK-PROGRAMM**

Eine *CMV-Infektion* wird definiert als eine PCR-Positivität in zwei aufeinander folgenden Assays, ohne klinische Zeichen oder Symptome. Die *Reaktivierung einer CMV-Infektion* wird definiert als eine auftretende CMV-Infektion nach zwei aufeinander folgenden negativen PCR Assays im Anschluss an die Behandlung einer initialen Episode einer Infektion. Eine *CMV-Krankheit* wird definiert als Nachweis von CMV mittels Kultur oder Early-Antigen-Detection-Tests von BAL-Proben nebst respiratorischen Zeichen, Symptomen mit pulmonalen Infiltraten im Röntgenbild oder histologischen Nachweisen einer Infektion aus anderen Organen. Eine CMV-Infektion oder Krankheit wird als *spät* bezeichnet, wenn sie nach Tag+100 nach Transplantation auftritt.

**Tab. 8.**

Diagnostische Algorithmen bei Verdacht auf eine CMV-Krankheit <sup>15</sup>

---

**Interstitielle Pneumonie bedingt durch CMV (CMV-IP)**


---

<b>Diagnostisches Vorgehen</b>	Thorax-Röntgen, Thorax CT-Scan (höhere Sensitivität), BAL
<b>Diagnose</b>	Interstitielle Pneumonie (radiologisch dokumentiert) + Identifikation von CMV mittels Viruskultur in BAL (PCR/Antigen Assay Screening von BAL noch nicht evaluiert)
<b>Wichtig</b>	Bei Verdacht auf CMV-IP sofortige Kombinationstherapie mit Ganciclovir + CMV Hyperimmunglobulin

---

**CMV Hepatitis**


---

<b>Diagnostisches Vorgehen</b>	Transkutane/juguläre Leberbiopsie
<b>Diagnose</b>	Klinische, chemische (Analyse) und histologische Diagnose einer Hepatitis + Dokumentation einer CMV-Detektion aus der Leberbiopsie durch In-situ-Hybridisierung oder Immunhistochemie

---

**CMV Enterokolitis**


---

<b>Diagnostisches Vorgehen</b>	Endoskopie + Biopsie (aufsteigendes Kolon und terminales Ileum sind bevorzugte Lokalisationen mit der größten Wahrscheinlichkeit, CMV nachzuweisen)
<b>Diagnose</b>	Diarrhö + endoskopische Zeichen einer Enterokolitis + Nachweis von CMV durch intestinale Biopsien (histologisch oder durch Virusisolation in Zellkulturen)

---

### 1.4.6 **PROPHYLAXE UND THERAPIE**

Da Studien bewiesen haben, dass eine prophylaktische antivirale Therapie bei seropositiven Patienten oder eine präemptive Therapie, die auf positiven Antigenämien beruht, die Inzidenz einer schweren CMV-Krankheit reduziert und das Überleben CMV-positiver Patienten verbessern kann, wurden diese Ansätze in die klinische Praxis übernommen. <sup>94, 95, 194, 223</sup>

In mehreren Studien wurde berichtet, dass Ganciclovir (GCV) als Prophylaxe oder präemptive Therapie das Auftreten einer CMV-Krankheit verringert und die CMV-Krankheit-assoziierte Mortalität senkt.<sup>167, 168, 223-234</sup>

Eine präemptive Therapie über eine kurze Zeit wird vorgezogen, weil eine andauernde GCV-Prophylaxe häufig mit Neutropenie und opportunistischen Infektionen assoziiert werden muss, die dann die positiven Effekte von GCV schmälern.<sup>225-227</sup> Daher konzentrierten sich viele Forscher auf eine präemptive Therapie und behandelten nur Patienten mit gesicherter CMV-Infektion oder Reaktivierung.<sup>101, 104, 105</sup>

Leider scheint belegt, dass die CMV-Seropositivität des Empfängers schwerer wiegt im Hinblick auf den Ausgang der Erkrankung als eine Ganciclovirbehandlung.<sup>275, 283</sup> Der negative Einfluss der CMV-Seropositivität auf die TRM trotz präemptiver Therapie mit Ganciclovir wurde auch bei allogenen verwandten Stammzelltransplantationen beschrieben,<sup>92</sup> allerdings noch mit einer starken Assoziation mit dem Auftreten einer GvHD.

Ganciclovir beugt effektiv einer CMV-Krankheit in den ersten 100 Tagen nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation vor, aber spät auf tretendes Auftreten der Krankheit wird immer häufiger beobachtet.

Bei seropositiven Empfängern allogener Transplantate, die vor Tag+100 Ganciclovir erhielten, tritt eine CMV-Infektion nämlich häufig auch erst spät auf. Diese Erkrankung hat eine hohe Rezidivrate, ist assoziiert mit einem schlechten Ausgang und kann durch immunologische und virale Faktoren vorhergesagt werden. Die Reaktivierung von CMV in den ersten drei Monaten und das Fehlen einer CMV-spezifischen Immunität scheinen von pathophysiologischen Prozessen abzuhängen. Die CMV-Pneumonie ist die häufigste Manifestation der spät auftretenden Krankheit, gefolgt von der gastrointestinalen Symptomatik. Die Fatalitätsrate für eine spät auftretende CMV-Krankheit ist der der Krankheiten, die in den ersten hundert Tagen nach Transplantation auftreten, ähnlich. Daher sollten Patienten mit später Krankheit erweiterte Nachbehandlung von mindestens dreimonatiger Dauer und vielleicht länger mit fortgesetzter Immunsuppression bekommen. Alternativ sollte engmaschige virologische Überwachung nach antiviraler Behandlung erfolgen. CMV-Antigenämie während der ersten drei Monate war in einer Untersuchung von *Boeckh et al* der größte Risikofaktor in multivariablen Modellen. Auch wichtig waren verspätetes

Engraftment der Lymphozyten, niedrige CD4-Zahlen und auch GvHD. Ob allerdings die GvHD an sich oder ihre Behandlung maßgeblich war, konnte auch hier nicht festgestellt werden.

Es gibt eine sehr starke Assoziation zwischen spätem Tod und virologischen Faktoren, unabhängig von GvHD, CMV-spezifischen T-Zell-Funktionen, Lymphopenie und CMV-Krankheit. Auch wenn ein Zusammenhang zwischen großer CMV-Viruslast und Tod bei Patienten, die eine HSCT hinter sich haben oder HIV-infiziert sind, erwiesen zu sein schien, blieb die CMV-spezifische T-Zell-Funktion unbedacht.<sup>235-237</sup> Mechanistisch resultiert die Assoziation zwischen großer Viruslast und Tod nicht nur aus den direkten Effekten von CMV, wie z.B. die fatale Pneumonie, sondern auch aus immunmodulatorischen Effekten von CMV, die möglicherweise eine größere Anfälligkeit für späte bakterielle und fungale Infektionen bedingen. Dieses Phänomen wurde auch bei CMV-seronegativen Empfängern von seropositiven Stammzelltransplantaten beschrieben.<sup>238</sup>

Jedenfalls stellt die spät auftretende CMV-Krankheit eine bedeutsame und potentiell fatale Komplikation bei Empfängern von seropositiven allogenen Transplantaten dar. Das Risiko kann bei Patienten, die nach drei Monaten nach Transplantationen noch leben, bis zu 18% betragen.<sup>239</sup> Obwohl CMV-Last und CMV-spezifische T-Zell-Immunität das Risiko für eine späte CMV-Krankheit und deren Ausgang determinieren, sind klinische Parameter wie eine frühere CMV-Infektion, GVHD oder niedrige CD4-Zahlen nützlich, um späte Präventionsstrategien abzuwägen.<sup>240</sup> Diese Erkenntnisse haben Gültigkeit bei myeloablativen und nonmyeloablativen Transplantationen.<sup>239, 241</sup> Die fortschreitende Überwachung der CMV-Last, der Antigenämie oder niedrigen Lymphozytenzahlen ist also nützlich, um das mögliche Risiko für eine späte CMV-Krankheit und Tod in der langfristigen Follow-up-Periode zu bestimmen. Die Optionen für die Prävention einer spät auftretenden CMV-Krankheit schließt eine erweiterte antivirale Prophylaxe oder die Fortführung einer präemptiven Therapie basierend auf quantitativen Antigenämie- oder CMV-DNA-Tests.<sup>242</sup> Da die CMV-Krankheit sich immer noch auch bei etlichen Patienten mit negativer Antigenämie oder undetektierbarer DNA entwickeln kann, sollte eine präemptive Strategie in Anlehnung an wöchentliche Kontrolluntersuchungen erfolgen. Die Probleme von Toxizität (von Valganciclovir), Wirksamkeit (von Valacyclovir), infektiöse Resistenz und der verzögerten CMV-spezifischen Immunrekonstitution bleiben bestehen. Immunologische Strategien wie der adoptive

Transfer von vom Spender abgeleiteten und CMV-spezifische T-Zell-Klone mögen in Zukunft hier vielleicht Abhilfe verschaffen.<sup>243, 244</sup>

#### **4 ZIEL DER ARBEIT**

Neben klinischen Risikofaktoren, die einen erheblichen Einfluss auf die Entstehung infektiöser Komplikationen nach Stammzelltransplantation haben, häufen sich die Indizien, dass diesen Erkrankungen auch eine genetische Komponente zu Grunde liegt. In verschiedenen genomweiten Suchen konnten auf unterschiedlichen humanen Chromosomen Kopplungsregionen identifiziert werden, die mit Aspergillose und CMV assoziierte Gene enthalten.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, in den bereits beschriebenen Kopplungsregionen (IL-10 und IFN- $\gamma$  für Aspergillose und IL-10 und MCP-1 für CMV) Kandidatengene zu identifizieren. Aufgrund der infektiologischen Ätiologie von Aspergillose und CMV wurden primär potentielle Kandidatengene mit immunologischer Funktion gewählt.

Anschliessend sollte für die auf diese Weise identifizierten Kandidatengene in öffentlichen Datenbanken nach bekannten Polymorphismen, vornehmlich SNPs, gefahndet werden. Das Vorhandensein dieser DNA-Variationen war daraufhin zu bestätigen, Kopplungsungleichgewichte der Polymorphismen zu verifizieren und eine mögliche Assoziation dieser Polymorphismen mit dem Risiko eines Auftretens von Aspergillose oder CMV zu untersuchen.

## 2 STUDIENTEILNEHMER, MATERIALEN UND METHODIK

### 2.1 STUDIENTEILNEHMER

#### 2.1.1 STUDIENTEILNEHMER ASPERGILLOSE

Das untersuchte Patientenkollektiv umfasste 139 Patienten, die aufgrund einer hämatologischen Erkrankung oder Neoplasie zwischen 1995 und 2003 eine allogene Stammzelltransplantation erhielten. Diese wurden in den Transplantationszentren der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen Abteilung Innere Medizin II ( $n = 84$ ), der Medizinischen Klinik der Universität Graz, Graz, Österreich ( $n = 26$ ), der Medizinischen Klinik der Universität Innsbruck, Innsbruck, Österreich ( $n = 16$ ) und der Medizinischen Klinik der Universität Huddinge, Stockholm, Schweden ( $n = 13$ ), durchgeführt.

Die Patienten bezogenen Daten wurden nach Prüfung durch das Ethikkomitee retrospektiv aus den entsprechenden Krankenakten über den stationären Krankenhausaufenthalt ermittelt.

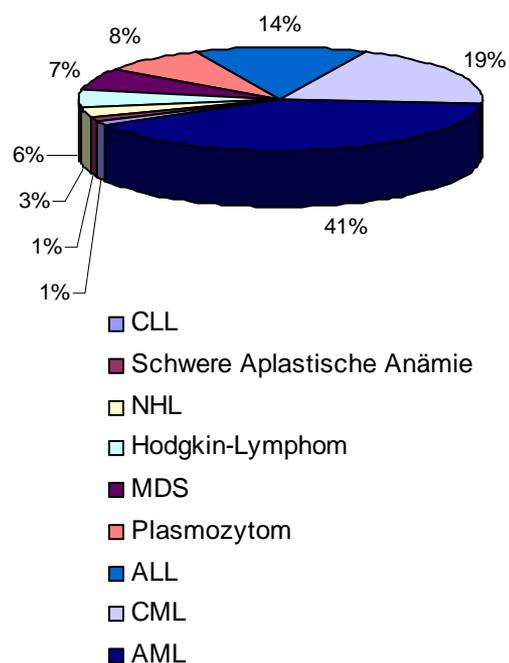
##### 2.1.1.1 KRANKHEITSVERTeilUNG

**Abb. 7.**

Krankheitsverteilung Aspergillose

Von den 139 Patienten dieser retrospektiven Studie waren 45 Frauen und 83 Männer; das Alter der Patienten lag zwischen 7 und 61 Jahren.

Die hämatologischen Krankheiten, denen sie unterlagen, schlossen akute myeloische Leukämie bei 57 (41%)



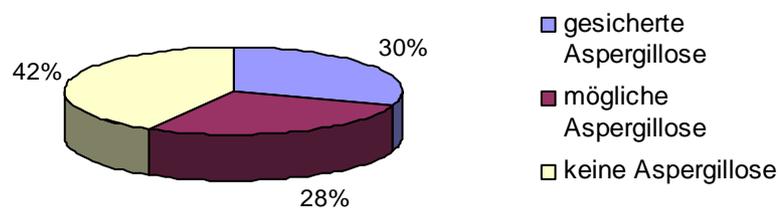
Patienten, akute lymphatische Leukämie bei 20 (14%), chronisch lymphatische Leukämie bei 2 (1%), Plasmozytom bei 11 (8%), Myelodysplastisches Syndrom bei 10 (7%), Hodgkin-Lymphom bei 8 (6%), Non-Hodgkin-Lymphom bei 4 (3%) und schwere aplastische Anämie bei 1 (1%) und chronische myeloische Leukämie bei 26 (19%) Patienten ein.

Zur Sicherung der Diagnosen wurden die Diagnosekriterien der *Invasive Fungal Infections Cooperative Group (IFICG)* der *European Organisation for Research on Treatment of Cancer (EORTC)* <sup>18</sup> und der *US Mycoses Study Group (MSG)* berücksichtigt.

Eine dokumentierte gesicherte Aspergillose konnte so bei  $n = 42$  (30 %) Patienten und eine mögliche Aspergillose bei  $n = 39$  (28%) Patienten gefunden werden.  $n = 58$  (42 %) Patienten zeigten keine Zeichen einer fungalen Infektion. Es gab keine Patienten mit einer Infektion des ZNS, die auf *Aspergillus* zurückgeführt werden konnte.

**Abb. 8.**

Prozentuale Verteilung gesicherte/mögliche/keine Aspergillosen



### 2.1.1.2 UNTERSUCHTE KLINISCHE PARAMETER

Tab. 9.

Untersuchte klinische Parameter Aspergillose

Untersuchte klinische Parameter	No. (%)
<b>Mittleres Empfängeralter</b>	37
<b>Männliches Geschlecht</b>	83 (59.7)
<b>Krankheit</b>	siehe Krankheitsverteilung
<b>Spendertyp</b>	
familiär identisch	58 (41.7)
nicht familiär identisch	81 (58.3)
<b>CD34-Selektion</b>	
selektiert	124 (88.9)
nicht selektiert	15 (11.1)
<b>Antifungaltherapie</b>	
ja	102 (73.6)
keine	37 (26.4)
<b>Kortikosteroide</b>	
keine	66 (47.2)
>1 mg/kg	15 (11.1)
>2 mg/kg	58 (41.7)
<b>Akute GvHD</b>	
Grad 0-I	93 (66.7)
Grad II-III	42 (30.6)
Grad IV	4 (2.8)
<b>Chron. GvHD</b>	
keine	126 (90.3)
limitiert	13 (9.7)
extensiv	0 (0.0)
<b>Resp. Virusinfektionen</b>	
ja	35 (25.0)
keine	104 (75.0)
<b>CMV</b>	
ja	46 (33.3)
nein	93 (66.7)

## 2.1.2 STUDIENTEILNEHMER CMV

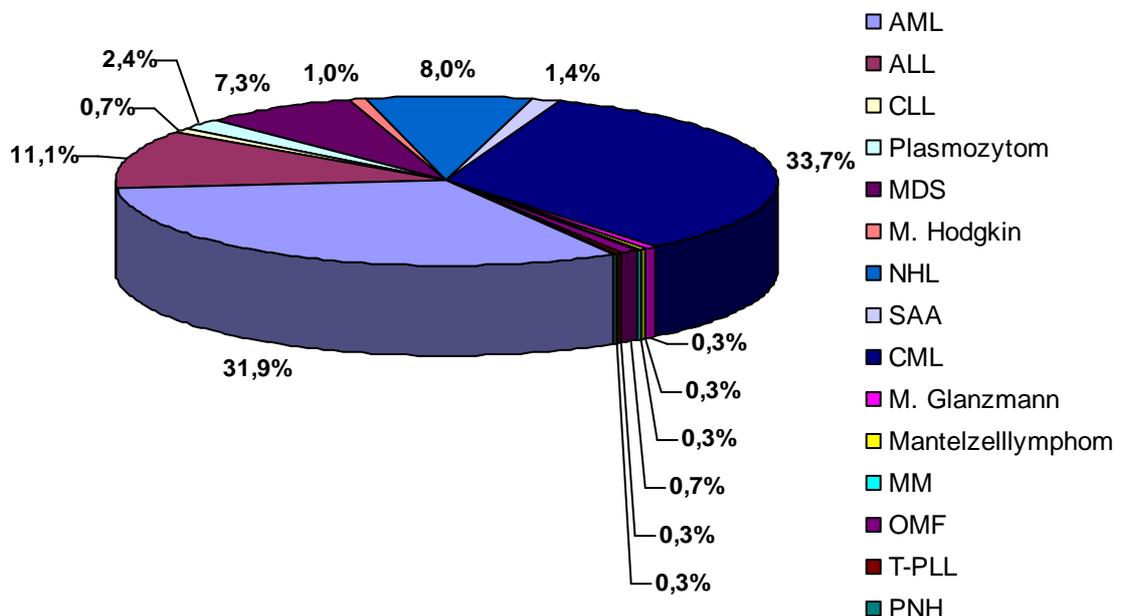
Das untersuchte Patientenkollektiv umfasste hier 242 Patienten, die aufgrund einer hämatologischen Erkrankung oder Neoplasie zwischen 1994 und 2003 ebenfalls eine allogene Stammzelltransplantation erhielten. Diese wurden in den Transplantationszentren der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen Abteilung Innere Medizin II, Tübingen ( $n= 83$ ), der Medizinischen Klinik der Universität Essen, Essen ( $n = 74$ ), des Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington ( $n = 57$ ), der Medizinischen Klinik der Universität Mannheim, Mannheim ( $n = 13$ ), der Medizinischen Klinik der Universität Perugia, Perugia, Italien ( $n = 8$ ), und der Medizinischen Klinik der Huddinge Universität Stockholm, Stockholm, Schweden ( $n = 7$ ), durchgeführt.

Die Patienten bezogenen Daten wurden analog zu der Untersuchung der an Aspergillose Erkrankten retrospektiv aus den entsprechenden Krankenakten über den stationären Krankenhausaufenthalt ermittelt.

### 2.1.2.1 KRANKHEITSVERTeilUNG

Abb. 9.

Krankheitsverteilung CMV

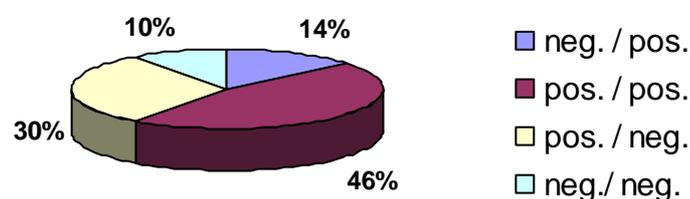


Von den 242 Patienten dieser retrospektiven Studie waren 102 Frauen und 140 Männer; das Alter der Patienten lag zwischen 7 und 71 Jahren. Die hämatologischen Krankheiten, denen sie unterlagen, schlossen akute myeloische Leukämie bei 76 Patienten, akute lymphatische Leukämie bei 26, chronisch lymphatische Leukämie bei 2 Patienten, Plasmozytom bei 7, Myelodysplastisches Syndrom bei 17, Hodgkin-Lymphom bei 3, Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) bei 21, schwere aplastische Anämie (SAA) bei 4, chronische myeloische Leukämie (CML) bei 79 Patienten, M. Glanzmann bei 1, Mantelzelllymphom bei 1, Multiples Myelom (MM) bei 1, Osteomyelofibrose (OMF) bei 2, prolymphozytische T-Zell-Leukämie (T-PLL) bei 1 und Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) bei 1 Patienten ein.

Ein positiver CMV-Serostatus von Patienten oder Spendern wurde mit Hilfe von *ELISA* bestätigt. Eine CMV-Reaktivierung galt gesichert bei einem positiven Nachweis von CMV-pp65-Antigen in Leukozyten mittels Immunfluoreszenz oder einem Nachweis von CMV-DNA mittels Polymerasekettenreaktion.

**Abb. 10.**

CMV-Serostatus



## 2.1.2.2 UNTERSUCHTE KLINISCHE PARAMETER

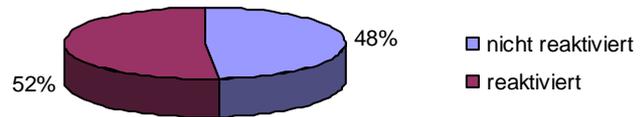
Tab. 10.

Untersuchte klinische Parameter CMV

Untersuchte klinische Parameter	No. (%)
<b>Mittleres Empfängeralter</b>	39
<b>Männliches Geschlecht</b>	140 (57.9)
<b>Krankheit</b>	siehe Krankheitsverteilung
<b>Spendertyp</b>	
familiär identisch	137 (56.6)
nicht familiär identisch	105 (43.4)
<b>CD34-Selektion</b>	
selektiert	84 (34.7)
nicht selektiert	158 (65.3)
<b>Kortikosteroide</b>	
keine	62 (25.7)
>1 mg/kg	42 (17.4)
>2 mg/kg	138 (56.9)
<b>Akute GvHD</b>	
Grad 0-I	131 (54.2)
Grad II-III	87 (36.1)
Grad IV	24 (9.7)
<b>Chron. GvHD</b>	
keine	172 (71.2)
limitiert	64 (26.4)
extensiv	6 (2.4)
<b>CMV-Krankheit</b>	
nicht reaktiviert	117 (48.3)
reaktiviert	125 (51.7)
reaktiviert und nicht erkrankt	66 (27.4)
reaktiviert und erkrankt	59 (24.3)
<b>CMV-Serostatus</b>	
neg. / pos.	34 (14.2)
pos. / pos.	111 (45.8)
pos. / neg.	72 (29.9)
neg. / neg.	25 (10.1)

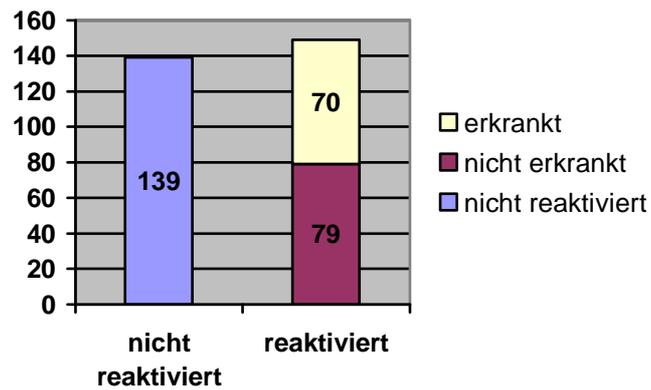
**Abb. 11a.**

CMV-Reaktivierungen



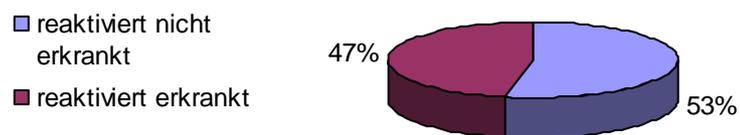
**Abb. 11b.**

CMV-Reaktivierungen und -Erkrankungen



**Abb. 11c.**

CMV-Reaktivierungen erkrankt vs. nicht erkrankt



## **2 MATERIALIEN UND METHODEN**

### **2.2.1 EXPERIMENTELLE METHODEN**

#### **2.2.1.1 GEWINNUNG DER BLUTPROBEN**

Nach entsprechender Aufklärung und Einwilligung wurde jedem Studienteilnehmer eine 5-10 ml EDTA-Venenblutprobe entnommen.

#### **2.2.1.2 VERARBEITUNG DER BLUTPROBEN**

Innerhalb 18 Stunden nach Blutentnahme fand die Weiterverarbeitung der Blutproben statt. Bis zur Aufbereitung wurden die Proben bei 4° bis 8°C gelagert. Dann wurden die EDTA-Venenblutröhrchen bei 2000 Umdrehungen pro Minute bei 10°C 10 Minuten lange zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipetiert. Die zellulären Bestandteile des Blutes und das Plasma wurden in getrennte Probengefäße abgefüllt und bis zum Abschluss aller Laboranalysen bei -80°C eingefroren. Dabei wurde jede Probe mit einer Nummer versehen: Entweder mit einer Studiennummer oder einer im PILZDATA Programm kreierten.

#### **2.2.1.3 KULTIVIERUNG DER REFERENZ-PILZKULTUREN**

DSM-Stämme (*German Collection of Microorganisms*) von medizinisch wichtigen Pilzarten, also auch *Aspergillus* (*A.fumigatis*, *A.flavus*, *A.niger*, *A.terreus*, *A.versicolor*) werden ständig vom Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen bei 30°C auf Sabouraud-Glucose-Agar (Becton Dickinson, Heidelberg) kultiviert. Bei *Aspergillus* spp. werden die Platten mit 10 ml steriler NaCl-Lösung bedeckt. Die optische Dichte der Lösungen wird im Spektralphotometer (Mc Farland-Index 0,5 = 10<sup>6</sup> Pilzzellen) gemessen. Verdünnungsreihen werden von 10<sup>5</sup> – 10<sup>10</sup> hergestellt,

eingeschlossen Verdünnungen bei 10,5 und 1 CFU pro ml. Blutproben (5 ml) von gesunden Probanden werden mit 500 µl Pilz-Suspension versetzt.

#### **2.2.1.4 ISOLATION HUMANER DNA**

Die Isolation der humanen DNA erfolgte mittels eines DNA-Isolierungs-Kits (*QIAmp® DNA Mini Kit*) der Firma *Qiagen, Hilden* und wurde analog dem Herstellungsprotokoll durchgeführt:

Die Blutproben wurden auf Zimmertemperatur erwärmt und anschließend im Wasserbad auf 56 °C erhitzt. Nach der Pipettierung von 200 µl Zell-Pellet in ein 1,5 ml Eppendorfcup erfolgte die Zugabe von 20 µl Proteinase und 200 µl AL Puffer. Diese Mischung wurde ca. 15 Sekunden gevortext, bis sich sämtliche Zellklumpen lösten. Danach folgte eine Inkubation bei 56 °C für 10-30 Minuten. Ein erneutes Vortexen der Probe geschah nach Zugabe von 200 µl Ethanol (100%). Damit das Filtrat entfernt werden konnte, musste noch einmal 1 Minute bei 15000 U/min zentrifugiert werden.

Das Waschen begann mit der Zugabe von 500 µl Puffer und anschließender einmütiger Zentrifugation bei 12000 U/min und Entfernung des Filtrats. Dann wurde in gleicher Weise wieder 500 µl Puffer zugegeben und diesmal 3 Minuten bei 15000 U/min zentrifugiert und das Filtrat entfernt. Der Überstand wurde dann in ein 1,5 ml Eppendorfcup überführt, 200 µl Puffer zugegeben, danach 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich 2 Minuten bei 10000 U/min zentrifugiert. Zum Schluss erfolgte das Vermessen mit 990 µl AquaBidest und 10 µl DNA.

#### **2.2.1.5 DNA-EXTRAKTION**

Zunächst erfolgte die Erythrozytenlyse. Dazu wurden 3-5 ml EDTA-Blut in einem 50 ml-Polypropylenröhrchen mit RCLB (Red Cell Lysis Buffer) auf 40 ml aufgefüllt, 10 Minuten unter ständiger Bewegung inkubiert und anschließend zweimal gewaschen. Die Leukozyten wurden durch Zugabe von 1ml WCLB (White Cell Lysis Buffer) und 45-minütige Inkubation bei 65 °C lysiert und erneut gewaschen. WCLB enthält

Proteinase K, ein Enzym, welches die Leukozytenlyse durch Spaltung der Peptidbindungen der Zellmembran einleitet.

**Tab. 11a.**

Zusammensetzung des "Red Cell Lysis Buffer" (RCLB)

<b>Inhaltsstoff</b>	<b>Konzentration</b>
<b>Tris-Puffer, pH 7,6</b>	10 mM
<b>Magnesiumchlorid</b>	5 mM
<b>Natriumchlorid</b>	10 mM

**Tab. 11b.**

Zusammensetzung des "White Cell Lysis Buffer" (WCLB)

<b>Inhaltsstoff</b>	<b>Konzentration</b>
<b>Tris-Puffer, pH 7,6</b>	10 mM
<b>EDTA</b>	10 mM
<b>Natriumchlorid</b>	50 mM
<b>Natriumdodecylsulfat</b>	0,2 %
<b>Proteinase K</b>	200 µl / ml

Zur Generierung von Sphaeroblasten mittels rekombinantem Lytikase-Puffer wurden zum Zellpellet 500 µl Lytikase-Puffer (5U) hinzugefügt, gevortext und 45 Minuten bei 37°C inkubiert.

Tab. 11c.

Zusammensetzung des Lytikase-Puffers

Inhaltsstoff	Konzentration
Tris-Puffer, pH 7,6	50 mM
EDTA	1 mM
$\beta$ -Mercaptoethanol	0,2 %
Rekombinante Lytikase	1 U / 100 $\mu$ l

Lytikase ist ein Enzym, welches  $\beta$ -1,3-Glucan-Verbindungen der fungalen Zellwände spaltet und die Ausbildung von Sphaeroblasten, also runder, geschwollener Pilzzellen, bewirkt. Eine rekombinante Form wird eingesetzt, um Kontaminationen mit DNA anderer Pilzspezies (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*) auszuschließen. (Löffler et al., 1999)

Danach folgte ein erneuter Waschschrift und die Pilzzellwandlyse wurde komplettiert. Die Sphaeroblasten wurden lysiert und die Proteine durch Inkubation bei 55 °C präzipitiert. 180  $\mu$ l Puffer und 20  $\mu$ l Proteinase K wurden hinzugefügt und 20 Minuten bei 55°C inkubieren gelassen. Dann erfolgte die Zugabe von 200  $\mu$ l Puffer und eine zehnmünütige Inkubation bei 70 °C zur Lysis und Präzipitation. Schließlich fügte man 210  $\mu$ l Ethanol hinzu, textete vor und zentrifugierte 1 Minute lang bei 5000 g. Danach wurden 500  $\mu$ l Puffer hinzugefügt und wieder 1 Minute lang bei 5000 g zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde mit einem zweiten Puffer und einer Zentrifugation bei 9000 g wiederholt. Daraufhin versah man die Lösung wiederum mit 50  $\mu$ l Puffer und zentrifugierte 1 Minute bei 5000 g. Dieser Lösungsvorgang wurde dann wiederholt, jedoch mit einer Zentrifugation von 9000 g. Die auf diesem Wege extrahierte DNA konnte etwa eine Woche lang im Kühlschrank gelagert werden, sollte danach aber besser im Tiefkühlschrank aufbewahrt werden.

## 2.2.1.6 DETEKTION VON ASPERGILLUS MITTELS PCR

### 2.2.1.6.1 PCR-ELISA

Die Detektion des PCR-Produktes erfolgte analog den Beschreibungen von *Löffler* (1997, *Löffler et al.*, 1998).<sup>245, 246</sup>

Der Nachweis der während der PCR mit Digoxigenindesoxyuraciltriphosphat markierten Amplifikate erfolgte durch biotinylierte Oligonukleotidsonden.

So wurden alle Proben des *PCR-ELISA-Tests* mit Oligonukleotiden von *A. fumigatus* und *Candida spp.* hybridisiert, die an ihrem 3'-Ende mit Biotin markiert waren.

Von allen Proben wurden 2 x 20 µl des PCR-Produkts in zwei Eppendorf-Hütchen pipettiert. Von der Kontroll-DNA wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt (1:1, 1:10, 1:100) und jeweils 10 µl in Eppendorf-Hütchen pipettiert.

Es erfolgte überall die Zugabe von 20 µl Denaturierungslösung, Vortexen und eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Hybridisierungslösung für *Aspergillus* enthielt 200 µl Hybridisierungs-Puffer + 2 pmol / ml Sonde pro Probe. Die für die Kontroll-DNA 10 µl in 1ml Hybridisierungspuffer. Es wurden alle Proben und Kontrollen mit 200 µl Hybridisierungs-Lösung versehen. Danach wieder Vortexen.

200µl der Mixtur wurden in ELISA-wells überführt, Schutzfolie wurde angebracht und es fand eine Inkubation von 3 Stunden bei 40 °C auf einem Schüttler statt.

Der Überstand wurde verworfen, der Rest mit 250 µl Waschpuffer dreimal gewaschen. Jedes well wurde mit 200 µl Antikörperlösung befüllt. Diese hatte mindestens eine Stunde vorher hergestellt sein sollen und zwar aus dem Antikörper und dem Puffer im Verhältnis 1:100. Eine Schutzfolie wurde wieder angebracht und es folgte eine Inkubation von 30 Minuten bei 40 °C auf dem Schüttler.

Der Überstand wurde abermals verworfen und der Rest diesmal sechsmal mit 250 µl Waschpuffer gewaschen. Jedes well wurde wieder mit 200µl Farblösung befüllt, welches mindestens 30 Minuten vorher hergestellt hatte sein sollen aus 1 ABTS-Tablette pro 5 ml Substrat-Puffer. Nach Anbringen einer Schutzfolie erfolgte wieder eine Inkubation von 30 Minuten bei 40 °C auf dem S chüttler.

Die Messung erfolgte im SLT Rainbow-Reader bei 405nm. Referenzfilter 492 nm.

Zuletzt fand die *Slot-Blot-Hybridisierung* statt. Hierzu wurde das PCR-Produkt denaturiert, 5 Minuten bei 95°C, dann sofort für 20 Minuten auf Eis. 10 µl des PCR-

Produkts wurden auf eine Hybond N+ Membran (AS) in der Slot Blot Kammer (MP) pipettiert. Die DNA wurde mit einem UV-Transiluminator 312nm, 12 Sekunden lang auf der Membran fixiert.

Die Membran ließ man 20 Minuten lang in 0,4 NaOH (M) inkubieren, dann wurde sie in 2 x SSPE (30 x SSPE: 4,5 M Natriumchlorid (M), 0,3 M Natriumhydrogenphosphat (M), 0,03 M EDTA (M)) neutralisiert.

**Tab. 12a.**

10-fach PCR-Puffer

Inhaltsstoff	Konzentration
Tris-Puffer, pH 8,3	10 mM
Kaliumchlorid	50 mM
Magnesiumchlorid	1 mM

Lagerung bei -20°C

Die anschließende Amplifikation der isolierten DNA erfolgte mittels der Polymerase-Kettenreaktion PCR unter sterilen Bedingungen. Hierzu wurden 10 µl Proben-DNA mit 40 µl PCR-Mastermix versetzt.

**Tab. 12b.**

Zusammensetzung des PCR-Mastermix

Inhaltsstoff	Volumen [µl]	Endkonzentration
10-fach-PCR-Puffer	27,2	vgl. Tabelle 7
H <sub>2</sub> O (sterilfiltriert)	5	
Magnesiumchlorid (25 mM)	2	5 µM
Desoxyadenosintriphosphat (200 µM)	1	200 µM
Desoxyguanosintriphosphat (200 µM)	1	200 µM
Desoxycytidintriphosphat (200 µM)	1	200 µM

<b>Desoxythymidintriphosphat (190µM)</b>	1	190 µM
<b>Digoxigenindesoxyuraciltriphosphat (10µM)</b>	1	10 µM
<b>Forward-Primer (24 µM)</b>	0,25	
<b>Reverse-Primer (24 µM)</b>	0,25	
<b>Taq-Polymerase</b>	0,3	
<b>DNA</b>	10	
<b><u>Gesamtvolumen</u></b>	50	

Tab. 12c.

Temperaturprofil

<b>Prozess</b>	<b>Dauer</b>	<b>Temperatur</b>
<b>Initialdenaturierung</b>	4 min	94 °C
<b>Amplifikation</b>	<b>Denaturierung</b>	30 s
	<b>Annealing</b>	60 s
	<b>Elongation</b>	120 s
	<b>→ 24 Zyklen</b>	
<b>Terminale Extension</b>	5 min	72°C

Gesamtdauer ca. 4 Stunden

### 2.2.1.6.2 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Durch Anlegen einer elektrischen Spannung können PCR-Amplifikationsprodukte in einem Agarosegel ihrer Länge nach aufgetrennt werden.

Diese Gel-Elektrophorese begann mit dem Zusatz von 2,5 µl 5 x Puffer zu 10 µl PCR-Produkt. Zur Kontrolle wurde der 100bp-Marker von *Life Technologies* benutzt. Es wurde ein 2% Agarose-Gel in 1 x TAE-Puffer gegossen. Vor dem Pipettieren des Gels wurde GelStar DNA-Färbung in einer Verdünnung 1:10000 hinzugefügt. Die Elektrophorese lief jeweils eine Stunde lang in einer Horizontal 11.14 Kammer bei 90 V. Danach konnte die DNA mit UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Polaroidkamera fotografiert werden.

**Tab. 13a.**

Zusammensetzung des 5 x Laufpuffers

Inhaltsstoff	Konzentration
Tris-Puffer, pH 7	50 mM
EDTA	50 mM
Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,5 %
Bromphenolblau	0,1 %

**Tab. 13b.**

Zusammensetzung des 1 x TAE-Puffers

Inhaltsstoff	Konzentration
Tris-Puffer, pH 7	2 M
Essigsäure, 96%	2 M
EDTA	0,1 M

### 2.2.1.7 DETEKTION VON CMV MITTELS PCR

#### 2.2.1.7.1 PCR-ELISA

Die Detektion von CMV mittels PCR erfolgte in Ablehnung an die Durchführung von *Einsele et al. (1991)*<sup>247</sup> und die Beschreibung von *Löffler (1994)*<sup>248</sup>. Das PCR-Amplifikat zur Bestimmung der HCMV-DNA ist 147 bp lang und liegt im Bereich des immediate-early-Genes 1,4 Exon.

Als PCR-Inhibitionskontrolle wurde ein humaner DNA-DRß 1 Gen-Abschnitt mit einer Länge von 327 bp verwandt, der jeweils im gleichen Ansatz amplifiziert worden war.

Als Negativkontrolle (Ampuwa) diene in jedem PCR-Ansatz zur Kontrolle der Spezifität.

#### **2.2.1.7.1.1 EINSTELLUNG DER PROBEN MITTELS AMPUWA**

Ein PCR-Reaktionsgefäß mit 80-120 ng DNA- bzw. Patientenprobe wurde auf 10 ml mit Ampuwa aufgefüllt.

#### **2.2.1.7.1.2 PRIMER**

Die Primer zur Amplifikation der HCMV-Genom-Segmente banden beide an das immediate-early-Gen 1,4 Exon. Dieses ist eine in verschiedenen HCMV-Stämmen hochkonservierte Region und häufig vorkommend, daher eignet sie sich gut zur Detektion. (*Jiwa et al, 1989*)<sup>249</sup>

Die Länge des Amplifikationsproduktes beträgt 147 bp.

**Tab. 14a.**

HCMV-Primersequenzen

<b>„forward primer“</b>	5'-AGCTGCATGA TGT GAGCAAG-3'
<b>Primerlänge</b>	20 bp (Basenpaar 1767-1786)
<b>„reverse primer“</b>	5'-GAAGGCTGAG TTCTTGGTAA-3'
<b>Primerlänge</b>	20 bp (Basenpaar 1894-1913)

Die Primer zur Amplifikation der Human-DNA stammten beide aus Bereichen des 2. Exons vom DR $\beta$ -1-Gen. Das Amplifikationsprodukt hatte eine Länge von 101 bp.

Tab. 14b.

DR $\beta$ -Primersequenzen

„forward primer“	5'-ACTGGAACAG CCACAAGGAC-3'
Primerlänge	20 bp (Basenpaar 1767-1786)
„reverse primer“	5'-CCGCTGCACT GTGAAGCTCT-3'
Primerlänge	20 bp (Basenpaar 1894-1913)

Kurz nach Transplantation musste eine ausreichende Menge an Patienten-DNA sichergestellt sein. Dies geschah anhand zu jeder Probe parallel amplifizierter DR $\beta$ -Primersequenzen, welche darüber hinaus auch dem Ausschluss von PCR-Inhibitoren dienten.

Die Herstellung erfolgte im Primersynthesizer, die Bestimmung ihrer jeweiligen Konzentration im Spektralphotometer. Dieselbe Konzentration von „Forward-“ und „Reverseprimer“ war die Voraussetzung für optimale Amplifikationsbedingungen. Diese war 250 ng/ $\mu$ l bei den HCMV-Primern und je 5 ng/ $\mu$ l bei den DR $\beta$ -Primern.

Tab. 14c.

PCR-Mix/Probe

	Stammkonzentration	Endkonzentration	Volumen
<b>HCMV-Primer-Mix</b>	Pr. 1 und 2 je 250 ng/ $\mu$ l	je 150 ng	0,6 $\mu$ l
<b>DR<math>\beta</math>-Primer-Mix</b>	Pr. 1 und 2 je 5 ng/ $\mu$ l	je 18 ng	3,6 $\mu$ l
<b>dNTPs</b>			
<b>(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)</b>	je 25 mM/250 $\mu$ l	0,5 mM	1,0 $\mu$ l
<b>Taq-Polymerase</b>	5 U/ $\mu$ l	1,5 U/ $\mu$ l	0,3 $\mu$ l
<b>10 x Puffer</b>	s.u.	s.u.	5,0 $\mu$ l
<b>Ampuwa</b>	-	-	29,5 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen PCR-Mix/Probe</b>		40 $\mu$ l	
<b>Volumen der DNA-Probe</b>		10 $\mu$ l	
<b>Endvolumen/Probe</b>		50 $\mu$ l	

Tab. 14d.

10 x PCR-Puffer

	Stammkonzentration	Endkonzentration
<b>Tris pH 9,6</b>	100 mM	10 mM
<b>NaCl</b>	500 mM	50 mM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	100 mM	10 mM
<b>BSA (Bovines Serum Albumin)</b>	1 µg/µl	5 µg/ 50µl

Das Vortexen erfolgte nach Zugabe der Substanzen zum Mastermix. Im Anschluss erfolgte die Überschichtung jeder Probe mit 70 µl Mineralöl.

### 2.2.1.7.1.3 PCR-VERLAUF MIT 34 ZYKLEN

Tab. 15.

PCR-Protokoll

Schritte	Zeitdauer	Temperatur in C°
<b>Initialdenaturierung (einmalig)</b>	240 sec	94
<b>Denaturierung</b>	60 sec	94
<b>Annealing, Extension</b>	180 sec	66
<b>term. Denaturierung (einmalig)</b>	300 sec	95

Um eine erneute Zusammenlagerung der denaturierten Einzelstränge zu verhindern, wurden die Proben nach der terminalen Denaturierung sofort auf Eis gelegt. 30 min später konnten die Proben unter Öl abgezogen werden. 43 µl je Probe wurde in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt.

#### 2.2.1.7.1.4 SLOT-BLOT-HYBRIDISIERUNG DER AMPLIFIKATE

##### 2.2.1.7.1.4.1 FIXIERUNG DER NUKLEINSÄUREN AUF EINER NYLONMEMBRAN

Eine Hybond N+-Nylonmembran wurde nach 20-minütigem Einweichen in Ampuwa in eine Miliblot-Kammer eingespannt. In jeden Kammerschlitz wurden jeweils 10 µl amplifizierte Probe pipettiert. Um die Proben in die Membran zu ziehen, wurde mit einer Wasserstrahlpumpe ein Vakuum erzeugt. Pro Kammerschlitz wurden zusätzlich 100 µl Aqua dest. zugegeben.

Die Vernetzung der Proben erfolgte mittels UV-Licht von 254 nm Wellenlänge und einer Intensität von 0,12 J/cm<sup>2</sup>.

Die Membran ließ man mit 0,4 N NaOH einweichen und bei Raumtemperatur 20 min inkubieren.

##### 2.2.1.7.1.4.2 PRÄHYBRIDISIERUNG

Die Prähybridisierung der beiden Slot-blot-Membranen für HCMV- und DRß-DNA erfolgte für 30 min in einer speziellen Lösung auf einer Horizontalwippe im Wärmeschrank bei 42 °C.

**Tab. 16.**

Zusammensetzung der Prähybridisierungslösung

	Stammkonzentration	Endkonzentration	Volumen
<b>Denhardts Lösung</b>	50 x	5 x	50 ml
<b>SSPE</b>	30 x	6 x	100 ml
<b>SDS</b>	10 %	0,02 %	1 ml
<b>N-Lauroylsarcosin-Na</b>	10 %	0,1 %	5 ml
<b>a.b.</b>	-	-	344 ml

**50 x Denhardts Lösung**

Jeweils 2 g BSA in 100 ml und 2 g Ficoll 400 und 2 g PVP 40 (Polyvinylpyrrolidon) in 100 ml Ampuwa lösen. Im Anschluss 30 min kochen und abgekühlt im Verhältnis 1:1 mischen.

### 30 x SSPE

<b>Natriumchlorid</b>	4,5 M
<b>Natiumdihydrogenphosphat-Dihydrat</b>	0,3 M
<b>EDTA</b>	0,03 M

### 10% Natriumdodecylsulfat (SDS)

10 g SDS in 90 ml Ampuwa bei 68 °C im Wasserbad lösen, pH auf 7,2 mit 0,1 N NaOH einstellen.

### 10% N-Lauroylsarcosin

5g N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz in 50 ml Ampuwa lösen, sterilfiltrieren.

## 2.2.1.7.1.4.3 MARKIERUNG DER HCMV-DETEKTIONSOLIGONUKLEOTIDE

Der Nachweis der Amplifikationsprodukte (HCMV-IE 1,4 Exon und HLA-DR $\beta$  1, 2. Exon) erfolge mittels spezifisch bindender Sonden.

**Tab. 17.**

Sonden

<b>1. HCMV (Oligosequenz)</b>	5'-GGGTGCACTG CAGGCTAAGG CCCGTGCTAA AAAGGATGA-3' Länge 40 bp
<b>2. DR<math>\beta</math> (Oligosequenz)</b>	5'-AGGCGGGCCG CGGTGGACAC CTACTgCAGA-3' Länge 30 bp

Die Markierung der Oligonukleotide erfolgte durch einen Boehringer-Markierungs-Kit mit dig-dUTP 4h bei 37 °C.

Dieser setzt sich wie folgt zusammen:

Tab. 18.

Markierungsansatz

	Stammkonzentration	Endkonzentration	Volumen
<b>Oligonukleotid</b>	30 pM	30 pM	1,5 µl
<b>Reaktionspuffer</b>	5 x	1x	5,0 µl
<b>CoCl<sub>2</sub></b>	25 mM	2,5 mM	2,5 µl
<b>Term. Transferase</b>	25 U/µl	25 U/µl	1,0 µl
<b>dig-dUTP</b>	1 mM	0,1 mM	2,5 µl
<b>Ampuwa</b>	-	-	12,5 µl
<b>Endvolumen</b>		25,0 µl	
<b>Lagerung</b>		- 20 °C	
<b>Dauer der Markierung</b>		4 h bei 37 °C	
<b>Einsatz der Sonde</b>		1 pmol/ml Hybridisierungslösung	

#### 2.2.1.7.1.4.4 HYBRIDISIERUNG

Die Hybridisierung der Membranen erfolgte durch 30minütige Inkubation bei 37 °C im Wärmeschrank durch die dig-dUTP markierten Sonden. Die Durchführung der Inkubation erfolgte in zwei verschiedenen Hybridisierungslösungen (HCMV und DRß).

Hybridisierungslösung:

Prähybridisierungslösung + 1 pmol/ml dig-dUTP markierte Sonde

#### 2.2.1.7.1.4.5 WASCHSCHRITTE

Als nächster Schritt erfolgten vier Waschungen zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonden:

2 Mal je 5 min bei Raumtemperatur in Waschlösung 1.

**Tab. 19a.**

Waschlösung 1

	<b>Stammkonzentration</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Volumen</b>
<b>SSPE</b>	30 x	2 x	66,7 ml
<b>SDS</b>	10 %	0,1 %	10 ml
<b>a.b.</b>	-	-	923,3 ml

Zwei Mal je sieben Minuten in Waschlösung 2, wobei die Waschttemperatur für HCMV bei 65 °C und die Waschttemperatur für DRβ-1 bei 55 °C lag.

**Tab. 19b.**

Waschlösung 2

	<b>Stammkonzentration</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Volumen</b>
<b>SSPE</b>	30 x	6 x	200 ml
<b>SDS</b>	10 %	1 %	100 ml
<b>a.b.</b>	-	-	700 ml

Vor der eigentlichen Detektion wurden die Membranen auf der Horizontalwippe bei Raumtemperatur einen Moment in Puffer 1 äquilibriert.

**Tab. 20.**

Puffer 1

	<b>Stammkonzentration</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Volumen</b>
<b>TrisPH</b>	1 M	100 mM	200 ml
<b>NaCL</b>	5 M	150 mM	60 ml
<b>a.b.</b>	-	-	1740 ml

1 M Tris erhielt man durch das Lösen von 12,11 g in 100 ml Ampuwa. Die pH-Wert-Einstellung wurde durch HCl conc. ermöglicht.

#### **2.2.1.7.1.4.6 ABBLOCKEN POSITIVER LADUNGEN**

Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen des für die immunhistochemische Detektion eingesetzten Antikörpers an den Membranen, wurden diese auf der Horizontalwippe 30 min bei Raumtemperatur in Puffer 2 inkubiert.

Puffer 2:

Lösen von 1% Boehringer-Blocking-Reagenz in 200 ml Puffer 1 bei 70 °C.

Im Anschluss wurden die Membranen ein weiteres Mal in Puffer 1 äquilibriert.

#### **2.2.1.7.1.4.7 HERSTELLUNG UND INKUBATION DER ANTIKÖRPERLÖSUNG**

Um die dig-UTP markierten Sonden nachzuweisen, folgte die Inkubation der Membranen für 30 min in Alkalischer-Phosphatase-gekoppeltem Anti-Digoxigenin-Antikörper bei Raumtemperatur auf der Horizontalwippe dem Einschweißen der Membranen in Polypropylenfolie.

**Tab. 21a.**

Antikörperlösung

	<b>Stammkonzentration</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Volumen</b>
Anti-Digoxigenin-AP	750 U/ml	150 U/ml	4 µl/Membran
Puffer 1	-	-	20 ml/Membran

Die Membranen wurden zwei Mal 10 Minuten in Puffer 1 bei Raumtemperatur auf der Horizontalwippe gespült. Danach erfolgte die Äquilibrierung der Membran in Puffer 3.

**Tab. 21b.**

Puffer 3

	Stammkonzentration	Endkonzentration	Volumen
<b>Tris pH 9,5</b>	1 M	100 mM	50 ml
<b>NaCl</b>	5 M	100 mM	10 ml
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1 M	50 mM	25 ml
<b>a.b.</b>	-	-	415 ml

### 2.2.1.7.2 SEMIQUANTITATIVE AUSWERTUNG MITTELS EICHKURVE

Zunächst erfolgte die Farbentwicklung zur Detektion der Amplifikationsprodukte. Nach erneutem Einschweißen der Membranen in Polypropylenfolie wurden sie in der unten beschriebenen Farblösung 2-4 h in einem dunkel abgeschlossenen Raum inkubiert.

**Tab. 22a.**

Farblösung

BCIP: 50 mg/ml gelöst in Dimethylformamid	34 µl/Membran
NBT 75 mg/ml	35 µl/Membran
Puffer 3	10 ml/Membran

Sobald alle Signale der Eichkurve auf der Membran gut sichtbar waren, wurde die Farbreaktion gestoppt. Im Anschluss wurde die Membran kurz in Puffer 4 inkubiert.

Tab. 22b.

Puffer 4

	Stammkonzentration	Endkonzentration	Volumen
<b>Tris pH 8,0</b>	1,0 M	10 mM	5 ml
<b>EDTA</b>	0,5 M	1 mM	1 ml
<b>a.b.</b>	-	-	494 ml

Die semiquantitative Auswertung der HCMV-Signale der Patientenproben erfolgte mittels einer durch parallel amplifizierte HCMV-DNA erstellten Eichkurve. (Hebart et al, 1996).<sup>250</sup> Ein semiquantitativer Vergleich der HCMV-Signal-Stärke aus Vollblut wurde mit den Signalen von 100 fg, 10 fg, 1 fg und 0,1 fg klonierter HCMV-DNA.

Die hierfür verwendete DNA stammt aus dem Genom des Stammes AD 169 aus dem immediate early-Gen 1,4 Exon. Die Klonierung des verwendeten Inserts pCM 6018 geschah unter Mitwirkung des bakteriellen Vektors pACYC 184 (Rüger et al, 1984).

251

Dieses Insert hatte eine Länge von 11076 bp und wurde nach Aufreinigung und photometrischer Vermessung als Standard eingesetzt.

Aus einer Stammkonzentration von 230 ng/µl klonierter HCMV-DNA wurde folgende Verdünnungsreihe hergestellt:

Tab. 23.

Slot-Blot-Signale der Eichkurve

+++	100 fg/5µl (~ 3000 Viruskopien)
++	10 fg/5µl (~ 300 Viruskopien)
+	1 fg/5µl (~ 30 Viruskopien)
-	0,1 fg/5µl (~ 3 Viruskopien)

Die Verdünnung erfolgte in 100 ng/μl zellulärer HCMV-negativer DNA.

## **2.2.2 GENETISCHE ANALYSE**

Es wurden mögliche funktionelle Polymorphismen in den Genen auffindig gemacht und dann in umfangreichen Patientenpopulationen untersucht.

Im Rahmen des Projekts sollten zum einen neue Risikogene identifiziert werden, zum anderen sollte die funktionelle Bedeutung dieser Gene und ihre Rolle im Rahmen infektiöser Komplikationen nach Stammzelltransplantation untersucht werden. Zur Suche nach neuen Aspergillose- und CMV-assoziierten Genen wurde eine Feinanalyse von vordefinierten Kandidatenregionen durch Genotypisierung von SNPs vorgenommen.

Ziel war es, Kandidatengene zu identifizieren, die mit einem erhöhten relativen Risiko für Aspergillose oder CMV assoziiert sind. Zunächst wurden Fall-/Kontroll-Assoziationsstudien mit SNPs als genetische Marker in Kandidatengenen durchgeführt. Assoziationen bestimmter SNP Allele mit erhöhtem Risiko für Aspergillose und CMV konnten so in einer epidemiologischen Stichprobe überprüft und eine positive Assoziation auf Grund von Populationsstratifikation oder Selektionsbias ausgeschlossen werden.

### **2.2.2.1 SNP-GENOTYPISIERUNG MITTELS PYROSEQUENZIERUNG**

Die Pyrosequenzierung ist eine Methode der DNA-Sequenzierung, die die Fähigkeit der DNA-Polymerase zum Ablesen der DNA benutzt. Nacheinander werden einzelne Nukleotide an einen neusynthetisierten DNA-Strang angehängt. Der erfolgreiche Einbau eines Nukleotids wird durch ein ausgeklügeltes Enzymsystem erfasst und in einen Lichtblitz übersetzt, der von einem Detektor erfasst wird.

Die Pyrosequenzierung liefert die genaue genetische Sequenz. Dabei wird die analysierte Mutation im Kontext der benachbarten genetischen Sequenz dargestellt (*Built-in Quality Control*). Da die Daten der Pyrosequenzierung quantitativ sind, eignen sie sich auch dazu, die relative Anzahl der Allele zu messen. Diese Eigenschaft macht es möglich, die DNA-Methylierung, Heterozygotie, Ploidie, Multi-Copy-Gene, Mischproben, hämatopoetischen Chimerismus und gemischte Genotypen bei heterogenen Proben (z.B. Tumor- und normale Zellen) zu quantifizieren. Darüber hinaus sind Pyrosequenzierungs-Assays mutationstolerant.

Anders als auf Hybridisierung beruhenden Assays, erzeugt die Pyrosequenzierung eine korrekte Sequenz unabhängig vom Auftreten einer neuen, unerwarteten Mutation. Außerdem macht die Pyrosequenzierung den Einsatz verschiedener Primer flexibler. Es ist einfach, einen Pyrosequenzierungs-Assay zu erstellen, um nahezu jeden genetischen Marker zu analysieren. ([www.pyrosequencing.com](http://www.pyrosequencing.com))

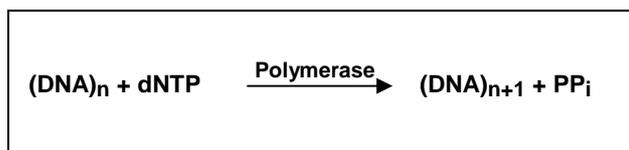
### Schritt 1

Ein Sequenzprimer wurde zu einer einsträngigen, PCR-amplifizierten DNA-Matrize hybridisiert und mit den Enzymen, DNA Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luziferase, Apyrase und den Substraten, Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS) und Luziferin inkubiert.

### Schritt 2

Das erste der vier Desoxytrinukleotidphosphate (dNTP) wurde zur Reaktion hinzugefügt. Die

Abb. 12a.

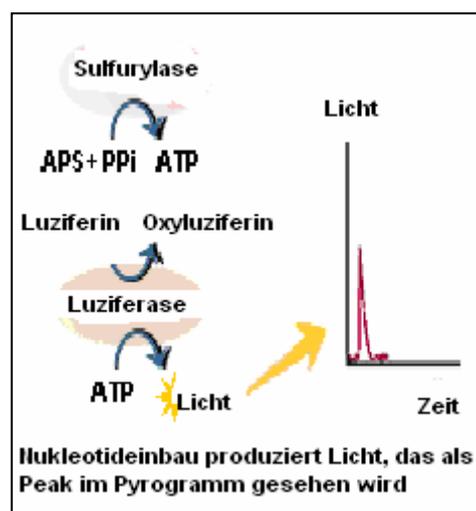


DNA-Polymerase katalysierte den Einbau des Desoxytrinukleotidphosphats in den DNA-Strang, sofern es komplementär zu der Base im Matrizenstrang war. Jeder Einbau ging mit dem Verlust eines Pyrophosphats ( $PP_i$ ) in einer äquimolaren Menge zur Menge der eingebauten Nukleotide einher.

### Schritt 3

Die ATP-Sulfurylase wandelte in Anwesenheit von Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS)  $PP_i$  quantitativ in ATP um. Dieses ATP trieb die Luziferase-vermittelte Umwandlung von Luziferin in Oxyluziferin voran, welches sichtbares Licht in einer Menge, die proportional zur ATP-Menge war, produzierte. Dieses Licht, was in der Luziferase-katalysierten Reaktion entstand, wurde mittels einer Charge-Coupled Device (CCD) Kamera

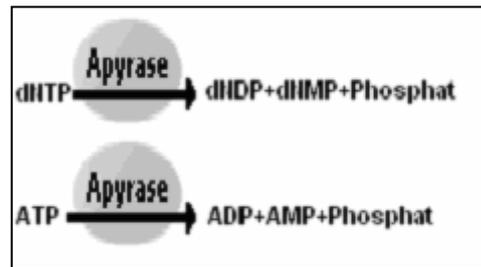
Abb. 12b.



detektiert und als Peak in einem Pyrogramm<sup>TM</sup> gesehen. Jedes Lichtsignal war proportional zur Anzahl der eingebauten Neukleotide.

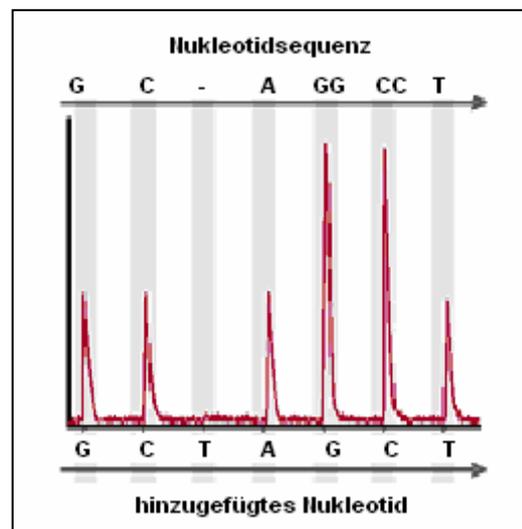
**Schritt 4**

Apyrase, ein Nukleotid-abbauendes Enzym, baute kontinuierlich nicht-eingebautes dNTP und überschüssiges ATP ab. Wenn der Abbau beendet war, wurde ein neues dNTP hinzugefügt.

**Abb. 12c.****Schritt 5**

Pro Schritt wurde immer nur ein dNTP hinzugefügt. Als Ersatz für das natürliche Desoxyadenosintriphosphat (dATP) wurde Desoxyadenosinalphathiotriphosphat (dATP $\alpha$ S) verwendet, da es effizient von der DNA-Polymerase verarbeitet, aber nicht von der Luziferase erkannt wird.

Im weiteren Verlauf wurde der komplementäre DNA-Strang gebildet und die Nukleotidsequenz vom Signalpeak im Pyrogramm bestimmt.

**Abb. 12d.**

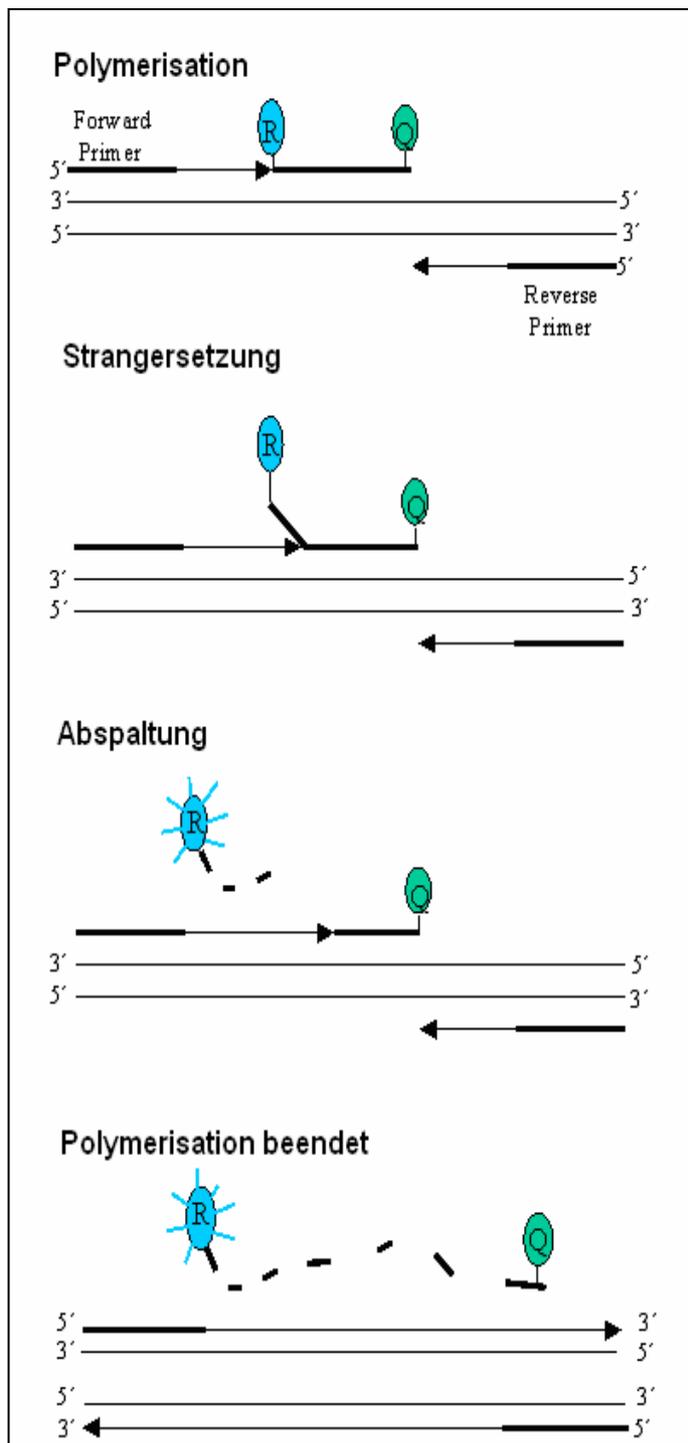
### 2.2.2.2 SNP-GENOTYPISIERUNG MITTELS REAL-TIME-QUANTITATIVER-PCR (TAQMAN-ASSAY<sup>TM</sup>)

Die real-time PCR wird eingesetzt, um die Expressionshöhen der RNA in einer Probe zu bestimmen. Analog der konventionellen RT-PCR wird die RNA in c-DNA umgeschrieben und diese mit spezifischen Primern amplifiziert. Bei einer normalen PCR lässt sich das Produkt jedoch nur sehr schwer quantifizieren, da bei einem typischen Verlauf die Reaktion von einer exponentiellen Phase, in der in jedem Zyklus nahezu eine Verdopplung des Produktes erfolgt, in eine Plateauphase übergeht, in der die Reaktion nahezu zum Stillstand kommt und keinerlei Amplifizierung mehr erfolgt. Da das Produkt normalerweise erst nach dem Eintritt in die Plateauphase quantifiziert wird, spiegelt es nicht die tatsächlichen Mengenverhältnisse durch diese Art der Messung wieder.

Eine sehr elegante Methode der Quantifizierung besteht in der Verwendung von sequenzspezifischen Primern in Verbindung mit einer doppelt fluoreszenzmarkierten Sonde, die ebenfalls nur an diese eine definierte Sequenz bindet. Der TaqMan-Assay macht sich die 5'-Nukleaseaktivität der Taq-Polymerase zunutze.

**Abb. 13.**

SNP-Genotypisierung mittels Realtime-quantitativer-PCR (Taqman-Assay™)



### Schritt 1

Den Sonden wurden zwei fluoreszierende Farbstoffe, ein Reporterfarbstoff (zumeist ein Fluoreszeinderivat) für das 5'-Ende und ein Quencher (Rhodaminderivat) für das 3'-Ende hinzugefügt. Das 3'-Ende war zusätzlich durch einen Phosphatrest blockiert, so dass es nicht verlängert wurde während der PCR-Reaktion.

### Schritt 2

Wurde nun die Sonde durch Licht einer bestimmten Wellenlänge  $\lambda$  angeregt (488 nm), so emittierte der Reporterfarbstoff Licht bei einer Wellenlänge  $\lambda'$ . Im Falle des verwendeten 6-Carboxy-Fluoreszin (FAM) lag die Emission bei 518 nm.

Die abgestrahlte Fluoreszenz des Reporters wurde durch die räumliche Nähe zum Quencher-Farbstoff durch einen

Fluoreszenzenergietransfer (FET) unterdrückt. Nach jedem Zyklus wurde die Sonde am 5'-Ende durch eine DNA-Polymerase ersetzt.

### *Schritt 3*

Im Laufe der PCR hybridisieren die Primer und die Sonde an ihre Zielsequenz. Dieses Ereignis aktiviert die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase und die Sonde wird hydrolysiert. Aufgrund der Spezifität der Sonde (maximal ein Basenaustausch wird von dem System toleriert) kann so die Zunahme eines PCR-Produktes während der gesamten Reaktion gemessen werden. Um Voluminaschwankungen aufgrund von Pipettierfehlern auszugleichen, enthält der für die Taq-Man-PCR verwendete Reaktionspuffer einen passiven Referenzfarbstoff (ROX), der in die Analyse der Fluoreszenzwerte einbezogen wird.

### *Schritt 4*

Sobald der Quencher abgespalten ist emittiert der Reporterfarbstoff seine charakteristische Fluoreszenz, die gemessen werden kann. Die Menge der gemessenen Fluoreszenz ist proportional zur Menge des produzierten PCR-Produktes.

Bei der Erstellung von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen stand die Typisierung von Kandidatengenen im Vordergrund. Neben der Kartenposition definiert durch Kopplungs- und Assoziationsstudien eines Gens, entscheidet die Kenntnis der biologischen Funktion über die Rangfolge des Kandidaten. Der Erfolg bei der Identifizierung von Dispositionsgenen hängt entscheidend ab von der Auswahl von Kandidatengenen und der Beherrschung der Informationen, die auf DNA-, RNA- und Proteinebene über chromosomale Kandidatenregionen zur Verfügung stehen.

Die rsSNPs aus dbSNP wurden in einer lokalen Datenbank abgefragt. Es ist eine Suche in Chromosomenregionen möglich, wobei nur die SNPs in genomischen Regionen von Genen angezeigt werden können. Dabei wird ein nicht-redundanter Satz von Genen benutzt, der aus RefSeq-Genen und Ensembl-Vorhersagen zusammengesetzt ist. Die genomischen Sequenzen upstream und downstream der SNPs können einfach heruntergeladen werden. Dabei stehen sowohl die Sequenzen aus dbSNP als auch die entsprechenden Sequenzen aus der Genom-Assemblierung

zum Download zur Verfügung. Repeat-Regionen sind markiert. Weiterhin sind alle benachbarten SNPs durch ein N maskiert, so dass sie beim Primer-Design berücksichtigt werden können.

## **2.2.3 STATISTISCHE ANALYSE**

### **2.2.3.1 FALL-KONTROLL-ASSOZIATIONSANALYSE**

Eine spezielle Kombination von SNPs auf einem Chromosom bezeichnet man als Haplotyp. Oftmals treten genetische Varianten gemeinsam auf, d.h. sie sind nicht unabhängig voneinander bzw. es besteht eine Korrelation. Diese Korrelation bezeichnet man auch als Kopplungsungleichgewicht oder 'Linkage Disequilibrium' (LD). Die statistische Auswertung erfolgte über eine Assoziationsanalyse basierend auf einem erwarteten Kopplungsungleichgewicht (Linkage disequilibrium) für die benannten Kandidatengenloci. Mit der Assoziationsanalyse konnte geprüft werden, ob sich die Frequenzen einzelner SNP-Allele oder auch Haplotypen in den extremen Merkmalsklassen voneinander unterscheiden.

Durch die Assoziationsstudie wurde versucht, Krankheitsgene auf dem Genom zu lokalisieren. Die Lokalisation beruhte auf der Detektion von Krankheitsassoziationen mit bestimmten Single-Nukleotid-Polymorphismen. Für die effiziente Durchführung einer Assoziationsstudie war die Auswahl der SNPs entscheidend. Ziel war es, eine möglichst informative Menge für die Studie zu verwenden. Wenn im Verlauf der Studie keine ausreichende Assoziation der betrachteten Loci gefunden wurde, war man gezwungen, die vorhandene Auswahl von typisierten SNPs zu erweitern. Nicht jeder beliebige, zusätzlich typisierte SNP konnte aber die Assoziationswahrscheinlichkeit verbessern. Der Informationsgewinn eines neuen, zu einer vorhandenen Menge hinzugefügten SNPs war abhängig von seiner Entfernung von und seinem Kopplungsgewicht zu den anderen SNPs.

Für die Gene mit mindestens einer hoch signifikanten Assoziation ( $p < 0,001$ ) wurden zusätzliche Haplotypenanalysen durchgeführt.

Zunächst mit dem Programm *EHplus* (*EH = estimated haplotype frequency*) (*Zhao et al, 2000*),<sup>252</sup> welches eines der wenigen Programme ist, welches Genotypfrequenzen hochpolymorpher Marker schätzt. Ihm liegt ein Permutationstest zugrunde.

Die Schätzung der Genotypfrequenzen erfolgte anhand der Allelfrequenzen der ermittelten Rohdaten. Eine mögliche höhere Signifikanz bestimmter Genotypen der Fallgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde mittels einer Simulation bestimmt.

Um Frequenzschätzungen für sog. „low-range“ (nebeneinander liegende) Haplotypen zu ermitteln, wendete man den von *Becker und Mitarbeiter* entwickelten ML-Schätzer (Maximum Likelihood) an. Man arbeitete mit dem „locus-iterative“ Modus des Programms *FAMHAP* (<http://uni-bonn.de/~umt70e/becker.html>).<sup>253, 254</sup>

Es wurde die kleinstmögliche Teilmenge („haplotype tagging SNPs“) an SNPs bestimmt, die es erlaubte, zwischen allen Haplotypen, die eine Frequenz >1% besitzen, zu unterscheiden. Mit *FAMHAP* konnte dann für jeden Haplotypen, transmittiert oder nicht transmittiert, die Frequenz geschätzt werden. Dies geschah mit Hilfe eines Wahrscheinlichkeits-Verhältnistest.

Um empirische p-Werte der log-likelihood Verhältnistests, die die HCMV-positive Gruppe mit der HCMV-negativen verglich, für jeden möglichen Haplotyp zu evaluieren, wurde der Monte-Carlo-Permutationstest mit einem Minimum an 100 000 Replikaten angewandt.

### **2.2.3.2 PRÜFUNG AUF HARDY-WEINBERG-GLEICHGEWICHT**

Voraussetzung für eine Assoziationsanalyse ist die Unabhängigkeit der Allelfrequenzen von der Verteilung der Allele im Genpool der Population. Die Häufigkeit der Allele darf sich nicht verändern, eine ideale Population muss vorliegen, sie muss sich im sog. *Hardy-Weinberg-Gleichgewicht* befinden. Das Hardy-Weinberg-Äquilibrium-Prinzip beschreibt die Gesetzmäßigkeit von Allelhäufigkeiten eines di-allelischen Locus nach der Formel  $(p+q)^2 = 1$ . Allel A tritt beispielsweise mit der Frequenz p, Allel a mit der Frequenz  $q = 1 - p$  auf. Durch Änderung der Mutationsfrequenz, Migration oder Selektion kann das Gleichgewicht verschoben

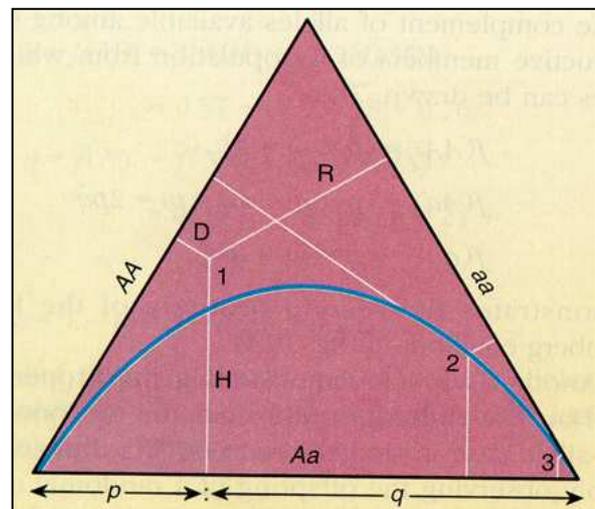
werden, sonst befinden sich die Häufigkeiten von allelischen Varianten in einer Population in einem Gleichgewicht.

Weicht die Genotypverteilung vom HWE ab, sind nach *Sasieni* allel-basierte Tests nicht geeignet, das wahre Ausmaß der Assoziation zu testen.

### 2.2.3.3 DARSTELLUNG ANHAND DE-FINETTI-DIAGRAMME

Eine mögliche Form der Darstellung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts (HWE) sind sog. De-Finetti-Diagramme. De Finetti entwarf 1926 die Darstellungsform der drei Genotyphäufigkeiten (AA, Aa, aa) in einem trilinearen Koordinatensystem. Jeder Punkt repräsentiert eine Stichprobe bzw. eine Population. Die Verhältnismäßigkeiten der drei Genotypen AA, Aa und aa werden durch die Längen der Senkrechten eines

Abb. 14. De-Finetti-Diagramm



Punktes P auf die drei Seiten eines gleichwertigen Dreieckes wiedergegeben. Das HWE ist im De-Finetti-Diagramm als Parabel dargestellt (Cannings, Edwards, 1968).

255

### 2.2.3.4 DURCHFÜHRUNG COCHRAN-ARMITAGE-TREND-TEST

Schließlich wurde noch der Cochran-Armitage-Trend-Test angewandt, um die Genotypen zu vergleichen. Er ist gegenüber Abweichungen des HWE robust.

**Tab. 24.**

Cochran-Armitage-Trend-Test

	0	1	2	Gesamtzahl	Teststatistik für 2x3- Genotyptabelle (Sasieni)
Fälle	$r_0$	$r_1$	$r_2$	$R$	Teststatistik für 2x2- Genotyptabelle (Sasieni)
Kontrollen	$s_0$	$s_1$	$s_2$	$S$	$\chi^2 = \frac{2N(2N(r_1 + 2r_2) - 2R(n_1 + 2n_2))^2}{(2R)2(N - R)(2N(n_1 + 2n_2) - (n_1 + 2n_2)^2)}$
Gesamtzahl	$n_0$	$n_1$	$n_2$	$N$	
					Chi <sup>2</sup> verteilt mit einem Freiheitsgrad

### 2.2.3.5 DURCHFÜHRUNG ALLELFREQUENZ-DIFFERENZ-TEST

Die Allelfrequenz beschreibt die relative Häufigkeit der Kopien eines Allels in einer Population. Sie berechnet sich aus der Zahl der Kopien eines bestimmten Allels dividiert durch die Gesamtzahl der Kopien aller Allele, die in der Population vorhanden sind, und ist unabhängig von der Verteilung der Allele im Genpool der Population. Mit dem Allelfrequenz-Differenz-Test lassen sich die Häufigkeiten eines Allels bei verschiedenen Populationen vergleichen, wenn die Häufigkeiten der Genotypen bekannt sind.

### 2.2.3.6 ALLELIC ODDS RATIO

**Tab. 25 a, b, c.**

Zur Angabe von *Odds* wurde in dieser Arbeit die Zahl der Erkrankten dividiert durch die Zahl der Nicht-Erkrankten.

$$R(A) = \frac{P(A)}{1 - P(A)}$$

Der Vergleich der Odds zweier Gruppen ergab das Odds-Verhältnis (Odds Ratio, OR).

$$R(A : B) = \frac{R(A)}{R(B)} = \frac{\frac{P(A)}{1-P(A)}}{\frac{P(B)}{1-P(B)}} = \frac{P(A) \cdot (1 - P(B))}{P(B) \cdot (1 - P(A))}$$

Dieses Maß gibt anschaulich an, wie viel häufiger das Erkrankungsrisiko im Vergleich zu einer Referenzstichprobe ist. Eine Odds Ratio >2 ist ein starker Hinweis auf das Vorliegen einer Assoziation.

	Allel 1	Allel 2
Fälle	a	b
Kontrollen	c	d
Allelic Odds Ratio = ad / bc		

### 2.2.3.7 FISHER'S EXAKTER TEST

Bei kleiner Fallzahl ( $n < 20$ ) war Fisher's exakter Test basierend auf der Hypergeometrischen Verteilung zu bevorzugen. Er ist ein Test für  $2 \times 2$  Feldertabellen und errechnet bei angenommener Unabhängigkeit zwischen den beiden Variablen und gegebenen Randwerten die exakte Wahrscheinlichkeit dafür, das beobachtete Ergebnis zu erhalten.

Tab. 26.

Fisher's exakter Test

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

Der kleinsten Häufigkeit entspricht a.

Sämtliche Vierfeldertafeln, die die gleichen Randsummen wie die ursprüngliche Tafel besitzen,

werden mit der Frage betrachtet, ob die beobachtete Besetzung der Tafel oder eine noch weniger wahrscheinliche rein zufällig zustande kommt (Sachs).

**ERGEBNISSE**

**3.1 ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNG DER KLINISCHEN RISIKOFAKTOREN**

**3.1.1 ERGEBNISSE ASPERGILLOSE**

**Tab. 27.**

Assoziation zwischen definierten klinischen Risikofaktoren und Aspergillose-Erkrankung <sup>a</sup>

Klinischer Parameter	Kontrolle vs. Aspergillose-Erkrankung
Akute GVHD	0.174
Chronische GVHD	0.367
Kortikosteroide >2mg/kg	1.000
CD34+ -Selektion	0.144
Resp. Virusinfektionen	<b>0.004</b>
Spendertyp nicht familiär identisch	0.259
CMV	0.183

<sup>a</sup> Patienten in der Kontrollgruppe zeigten keine Aspergillose-Erkrankung. Signifikante p-Werte (<0.05), die mit Hilfe des Armitage-Trend-Tests ermittelt wurden, sind unterstrichen, p-Werte <0.01 sind fett gedruckt. Die Positionen der SNPs in den berücksichtigten Genen wurden bei <http://snpper.chip.org> ermittelt.

**3.1.2 ERGEBNISSE CMV**

**Tab. 28.**

Assoziation zwischen definierten klinischen Risikofaktoren und HCMV-Reaktivierung und –Erkrankung  
*a*

Klinischer Parameter	Kontrolle vs. HCMV positiv	Kontrolle vs. Reaktivierung	Kontrolle vs. Erkrankung	Reaktivierung vs. Erkrankung
Akute GVHD	<u>0.031</u>	1.000	<b>0.001</b>	<b>&lt; 0.001</b>
Chronische GVHD	1.000	0.059	0.231	<b>0.003</b>
Kortikosteroide >2mg/kg	0.143	<u>0.036</u>	0.452	0.959
CD34+-Selektion	0.242	<u>0.037</u>	<b>0.001</b>	<b>&lt; 0.001</b>
CMV-Serostatus <sup>b</sup> + / +	<b>0.005</b>	<b>&lt; 0.001</b>	0.250	0.390
CMV-Serostatus + / -	<b>0.006</b>	<b>0.005</b>	<u>0.046</u>	0.552
CMV-Serostatus - / +	<b>0.007</b>	<b>&lt; 0.001</b>	0.124	0.817

<sup>a</sup> Patienten in der Kontrollgruppe zeigten keine HCMV-Reaktivierung. Signifikante p-Werte (<0.05), die mit Hilfe des Armitage-Trend-Tests ermittelt wurden, sind unterstrichen, p-Werte <0.01 sind fett gedruckt. Die Positionen der SNPs in den berücksichtigten Genen wurden bei <http://snpper.chip.org> ermittelt.

<sup>b</sup> Serostatus des Spenders / Serostatus des Empfängers

### 3.2 ASSOZIATIONSERGEBNISSE

#### 3.2.1 ERGEBNISSE ASPERGILLOSE

Jedes SNP wurde mittels Single-Marker-Analyse analysiert, wobei 3/84 Markern eine signifikante Assoziation, 4/84 Marker eine hoch signifikante Assoziation mit der Erkrankung an einer Aspergillose ( $p < 0.01$ ) zeigen. Von den signifikanten Markern sind einer im IL4-Gen (rs2070874) und zwei im IL10-Gen (rs1800896, rs1878672) lokalisiert, die vier hoch signifikanten Marker verteilen sich auf das CXCL10-Gen (rs1554013, rs3921, rs4257674) und das IFN- $\gamma$ -Gen (rs2069705).

Der niedrigste Wert  $p = 0.001$  ist mit dem Marker rs4257674 im CXCL10-Gen auszumachen.

77/84 SNPs der Gene CCL2, CCR1, CCR5, CCR6, CCR7, CLEC7A, ICAM1, IL6, IL12b, IL18, SCYA20, TLR 2, TLR 4 und TNF- $\alpha$  konnten nicht mit einer Erkrankung an Aspergillose assoziiert werden.

Außer dem Marker rs4986790 (TLR4) aus der Kontrollgruppe wich kein Marker vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab. So gab es keinen Anhalt für Populations-Substruktur, Populationsvermischung oder systematische Genotypisierungsartefakte.

**Tab. 29.**

Assoziation zwischen genetischen Polymorphismen in den Genen IFN- $\gamma$  und IL-10 und einer Aspergillose –Erkrankung <sup>a</sup>

Gen	dbSNP <sup>c</sup> No.	Nukleotidposition (Allel) <sup>b</sup>	Kontrolle vs. Aspergilloseerkrankung
<b>CCL2</b> (17q11.2-q12)	rs1024611	-2581 C/T	0.192
	rs4586	901 C/T	0.074
	rs13900	1543 C/T	0.122
<b>CCR1</b> (3p21)	rs1491955	11825 C/T	0.892
	rs3136666	1505 C/T	0.971
	rs3136665	1235 C/T	0.388

	rs3136664	381 A/G	0.877
	rs3136663	-423 A/G	0.985
	rs3176826	-1780 C/T	0.335
	rs3176825	-2420 A/C	0.943
	rs1491961	-4544 C/T	0.130
	rs1799988	-2135 C/T	0.391
	rs1800023	-2086 A/G	0.894
<b>CCR5</b> (3p21)	rs17141079	10176 A/T	0.879
	rs2734648	-2554 G/T	0.838
	rs746492	2919 A/C	0.298
	r s1331299	-16156 C/T	0.118
	rs1855025	-12029 C/T	0.498
	rs3093016	-7266 C/T	0.729
	rs3093015	-4551 C/G	0.323
<b>CCR6</b> (6q27)	rs3093010	-1016 A/C	0.303
	rs3093009	-146 A/G	0.838
	rs3093007	153 C/T	0.774
	rs2071171	420 C/T	0.617
	rs3093004	3147 A/G	0.478
	rs2229095	10440 A/G	0.810
	rs2023906	7976 A/G	0.319
<b>CCR7</b> (17q12-q21.2)	rs3136689	6560 C/T	0.722
	rs3136687	3766 A/G	0.366
	rs3136686	2326 A/T	0.063
	rs3136685	1863 A/G	0.955
<b>CLEC7A</b> (12p13.2)	rs2078178	6120 C/T	0.254
<b>CXCL10</b> (4q21)	rs1554013	11101 C/T	<b>0.007</b>
	rs3921	1642 C/G	<b>0.003</b>

	rs4859588	908 A/G	0.057
	rs4257674	-1101 A/G	<b>0.001</b>
<b>ICAM1</b> (19p13.3-p13.2)	rs5491	3705 A/T	0.182
	rs281432	8823 C/G	0.815
	rs2069727	5173 A/G	0.285
	rs2069718	3234 C/T	0.205
	rs2069714	2352 A/C	0.944
<b>IFNG</b> (12q14)	rs1861493	2200 A/G	0.115
	rs1861494	1987 C/T	0.211
	rs2069711	186 G/T	0.939
	rs2069705	-1616 C/T	<b>0.010</b>
	rs2070874	-33 C/T	<u>0.037</u>
<b>IL4</b> (5q31.1)	rs734244	984 A/G	0.397
	rs2227284	2983 A/C	0.633
	rs1554606	1826 G/T	0.218
<b>IL6</b> (7p21)	rs2069845	3268 A/G	0.784
	rs3024492	1669 A/T	0.070
	rs1800871	-854 C/T	0.448
<b>IL10</b> (1q31-q32)	rs1800896	-1117 A/G	<u>0.046</u>
	rs1878672	2068 C/G	<u>0.025</u>
	rs1518111	1136 A/G	0.337
	rs1368439	11777 G/T	0.862
	rs2569253	2798 C/T	0.121
<b>IL12B</b> (5q31.1-q33.1)	rs3181217	1521 A/G	0.544
	rs2195940	9439 C/T	0.058
	rs3213097	5112 A/T	0.279
<b>IL18</b> (11q22.2-q22.3)	rs3882891	11016 A/C	0.400

	rs4937113	-3945 A/T	0.508
	rs2043055	-5848 A/G	1.000
	rs1834481	1950 C/G	0.187
	rs2396506	1953 A/G	0.387
	rs2396507	2077 C/T	0.964
	rs3138114	1710 C/G	0.933
<b>SCYA20</b> (2q33-q37)	rs3176897	960 A/G	0.137
	rs2174626	2764 G/T	0.934
	rs2135483	2846 C/T	0.915
	rs940339	6635 A/G	0.271
	rs1898830	-15607 A/G	0.152
<b>TLR2</b> (4q32)	rs3804099	597 C/T	0.349
	rs3804100	1350 C/T	0.152
	rs1927911	-4953 C/T	0.918
	rs4986790	296 A/G	0.115
<b>TLR4</b> (9q32-q33)	rs2737191	-12292 A/G	0.621
	rs5030728	-725 A/G	0.321
	rs1554973	5806 C/T	0.711
	rs1800629	-488 A/G	0.285
	rs2228088	87 G/T	0.969
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> (6p21.3)	rs3093663	707 C/T	0.860
	rs3093664	1124 A/G	0.301
	rs3093665	1873 A/C	0.487

<sup>a</sup> Patienten in der Kontrollgruppe zeigten keine Aspergillose-Erkrankung. Signifikante p-Werte (<0.05), die mit Hilfe des Armitage Trend Tests ermittelt wurden, sind unterstrichen, p-Werte <0.01 sind fett gedruckt. Die Positionen der SNPs in den berücksichtigten Genen wurden bei <http://snpper.chip.org> ermittelt.

<sup>b</sup> Bei signifikanten Markern sind die Risikoallele fett gedruckt.

<sup>c</sup> dbSNP, SNP Database

### 3.2.2 ERGEBNISSE CMV

Jedes SNP wurde auch hier mittels Single-Marker-Analyse analysiert, wobei 9/80 Markern eine signifikante Assoziation, 5/80 Marker eine hoch signifikante Assoziation mit einer HCMV-Reaktivierung oder –Erkrankung ( $p < 0.01$ ) zeigten. Diese waren im CCR5-Gen, im MCP1-Gen und im IL-10-Gen lokalisiert. Die Untersuchung von 71/80 Markern der Gene CCL20, CCR1, CCR6, CCR7, CXCL10, IFNG, IL12B, IL18, SCYA20, TLR2, TLR4 und TNFA blieb ohne nennenswerte Ergebnisse. Hier konnten mit dem Cochran-Armitage-Trend-Test keine signifikanten Assoziationen mit dem Auftreten einer HCMV-Reaktivierung oder -Krankheit gefunden werden.

Im IL-4 und IL-6-Gen mussten zehn Marker aus der statistischen Analyse herausgenommen werden aufgrund zu niedriger Call Rates.

Außer dem Marker rs13900 im MCP-1-Gen und rs3024496 und rs1518111 im IL-10-Gen wichen bei Patienten mit CMV-Erkrankung keine Marker vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab. Auch nicht in der Kontrollgruppe.

Insgesamt kann man vier Marker der Gene CCR5, MCP-1 und IL-10 mit einer HCMV-DNAämie - ungeachtet einer Erkrankung – in Zusammenhang bringen. Drei davon mit hoch signifikanten p-Werten.

Für diese drei Gene wurde eine zusätzliche Haplotypanalyse mit den Programmen EHplus<sup>252</sup> und FAMHAP<sup>253, 254</sup> durchgeführt. Um die HCMV-positive mit der HCMV-negativen Kontrollgruppe bei jedem einzelnen Haplotypen zu vergleichen, wurde die Monte-Carlo-Permutationsmethode mit einem Minimum an 100.000 Replikationen angewandt mit Hilfe derer man empirische p-Werte des Log-likelihood-Ratio-Tests berechnen konnte.

**Tab. 30.**

Assoziation zwischen genetischen Polymorphismen in den Genen CCR5, MCP1 und IL-10 und einer HCMV-Reaktivierung und –Erkrankung<sup>a</sup>

Gen und dbSNP <sup>c</sup> No.	Nukleotid- position (Allel) <sup>b</sup>	Kontrolle vs. HCMV pos	Kontrolle vs. Reaktivierung	Kontrolle vs. Erkrankung	Reaktivierung vs. Erkrankung
<b>CCR5 (3p21)</b>					
rs2734648	-2554 ( <b>G/T</b> )	0.182	0.671	<u>0.014</u>	<u>0.017</u>
rs1799988	-2135 (C/T)	0.623	0.896	0.534	0.687
rs1800023	-2086 ( <b>A/G</b> )	0.208	0.497	<u>0.011</u>	<b>0.009</b>
rs746492	2919 (A/C)	0.346	0.965	0.150	0.205
rs17141079	10176 (A/T)	0.728	0.214	0.119	<u>0.018</u>
<b>MCP1 (17q11.2- q21.1)</b>					
rs1024611	-2581 ( <b>C/T</b> )	<u>0.034</u>	<u>0.029</u>	0.272	0.570
rs4586	901 (C/T)	0.585	0.388	0.747	0.353
rs13900	1543 (C/T)	<b>0.006</b>	<u>0.021</u>	<u>0.014</u>	0.476
<b>IL-10 (1q31-q32)</b>					
rs1800893	-1387 ( <b>A/G</b> )	0.854	0.248	0.153	<b>0.009</b>
rs1800896	-1117 ( <b>A/G</b> )	<b>0.007</b>	0.147	<b>0.001</b>	<u>0.016</u>
rs1800871	-854 (C/T)	0.571	0.499	0.907	<u>0.745</u>
rs1518111	1136 (A/G)	0.496	0.134	0.870	0.194
rs1554286	1548 (C/T)	0.383	0.099	0.794	0.092
rs3024492	1668 ( <b>A/T</b> )	0.484	0.420	0.097	<u>0.035</u>
rs1878672	2068 (C/ <b>G</b> )	<b>0.010</b>	0.115	<b>0.003</b>	0.060

<sup>a</sup> Patienten in der Kontrollgruppe zeigten keine HCMV-Reaktivierung. Signifikante p-Werte (<0.05), die mit Hilfe des Armitage Trend Tests ermittelt wurden, sind unterstrichen, p-Werte <0.01 sind fett gedruckt. Die Positionen der SNPs in den berücksichtigten Genen wurden bei <http://snpper.chip.org> ermittelt.

<sup>b</sup> Bei signifikanten Markern sind die Risikoallele fett gedruckt.

<sup>c</sup> dbSNP, SNP Database

---

## **DISKUSSION**

Entgegen der allgemeinen Meinung konnten mit p-Werten zwischen 0.16 und 0.004 keine signifikanten Assoziationen der klassischen klinischen Risikofaktoren wie akuter oder chronischer GvHD, Kortikosteroidgabe, CD34<sup>+</sup>-Selektion, Spendertyp oder CMV mit dem Auftreten einer Aspergillose gefunden werden. Aufgrund der kleinen Fallzahlen ist bei der Interpretation der p-Werte allerdings zu bedenken, dass sich nur sehr deutliche Assoziationen nachweisen lassen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung lassen lediglich Tendenzen, also schwache Signifikanzen erkennen.

Die einzige starke Assoziation konnte für respiratorische Virusinfektionen und Aspergillose mit einem p-Wert von 0.004 festgestellt werden. Diese Assoziation ist bereits durch diverse Studien bekannt, mehrfach beschrieben ist der Zusammenhang mit dem Influenza-Virus A und B.<sup>256-260</sup>

Dieser Zusammenhang könnte damit erklärt werden, dass funktionseingeschränkte pulmonale Phagozyten sensibler für Lungenerkrankungen wie die Aspergillose sind.<sup>261</sup>

Die Rekrutierung von inflammatorischen Zellen und deren Aktivierung hängt hauptsächlich von lokalen Zytokinaktivitäten ab.<sup>262</sup>

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass Pilzsporen, Toxine und andere zellulären Komponenten eine spezifische IgE- und IgG-Produktion induzieren können, die in einer bronchialen Hyperreaktivität resultiert.<sup>263, 264</sup> Allerdings provozieren Pilze nicht immer allergische IgE-abhängige Antworten; sie können auch als Immunmodulatoren wirken. Bestandteile der fungalen Zellwand und Konidien sind dafür bekannt, als Zytokininduktoren und Entzündungserreger zu agieren.<sup>265, 266</sup>

Die Analyse der Genpolymorphismen von Zytokinen und Zytokinrezeptoren im Zusammenhang mit Aspergillose brachte sehr interessante Ergebnisse. 7 Marker konnten als signifikant bewertet werden, 4 davon mit p-Werten <0.01 sogar als hoch signifikant. Gleich 3 hoch signifikante Marker fanden sich im CXCL10-Gen (rs1554013 (C/T), rs3921 (C/G), rs4257674 (A/G)), darunter ebenfalls der niedrigste errechnete Wert p=0.001 (rs4257674). Der vierte hoch signifikante SNP (rs2069705 (C/T)) ist eine Mutation im IFN- $\gamma$ -Gen.

Von den signifikanten Markern mit p-Werten  $<0.05$  sind einer im IL4-Gen (rs2070874) und zwei im IL10-Gen (rs1800896 (-1086, G>A), rs1878672 (2068, G>C)) lokalisiert.

Eine Haplotypanalyse der Marker rs1554013 (C/T), rs3921 (C/G), rs4859588 (A/G) and rs4257674 (A/G) bestätigte die Single-Marker-Analyse und identifizierte "CGAG" als High-risk-Haplotyp ( $p = 0.008$ ).

Der Chemokin (C-X-C Motif) Ligand 10 (Syn.  $\gamma$ -IP10, IP-10, CXCL10 entsprechend der Nomenklatur für Chemokine und Chemokinrezeptoren<sup>267</sup>) ist ein kleines Zytokin, das zur CXC-Chemokinfamilie gehört. Je nach Position des Zysteinrests im voll entwickelten Protein unterteilt man die Superfamilie der Chemoattraktanten für Leukozyten in vier Gruppen (C, CC, CXC, and CX3C).<sup>268-271</sup>

Das Gen für CXCL10 ist auf dem Chromosom 4 in einem Cluster unter mehreren anderen CXC-Chemokinen lokalisiert. Es wird von Monozyten, Endothelzellen und Fibroblasten als Antwort auf IFN- $\gamma$  sezerniert.

Im CXCL10 Promoter soll es zwischen den Nukleotidpositionen -2002 und -930 eine potentiell negativ regulatorische Region für IFN- $\gamma$  geben. Interessanterweise liegt einer der Marker, den wir gefunden haben (rs4257674, -1101,  $p = 0.001$ ), genau in dieser Region.

CXCL10 entfaltet seine Effekte, in dem es an den Zelloberflächenrezeptor CXCR3 bindet.<sup>272, 273</sup> Die Expression von Chemokinrezeptoren an der Zelloberfläche von immunkompetenten pulmonalen Zellen und die Interaktionen mit ihren spezifischen Liganden spielen eine Rolle bei der Akkumulation von inflammatorischen Zellen in der Lungenmikroumgebung und der Vermittlung von lokalen Hypersensitivitätsreaktionen.<sup>274</sup>

So werden CXCL10 mehrere Funktionen wie die Chemoattraktion von Monozyten und Th1-Zellen, Promotion der T-Zell-Adhäsion und Endothelzellen, Antitumoraktivität und Hemmung der Koloniebildung des Knochenmarks und Angiogenese zugeschrieben. Es wird auch seine Bedeutung bei den pulmonalen T-Zell-Antworten klar, denn der zentrale Punkt derer Pathogenese ist der organspezifische Verkehr von T-Lymphozyten.<sup>274, 275</sup>

Kürzlich wurde gezeigt, dass eine antigenspezifische Proliferation von T-Zellen bei gesunden Individuen und bei Patienten, die eine Aspergillose überwunden haben,

auftrat.<sup>276</sup> Es wurde ebenso festgestellt, dass eine Th1/Th2-Dysregulation und ein Übergewicht an Th2-Immunantworten den Verlauf einer IA negativ beeinflussen.<sup>276</sup>

Bei der Analyse der Expression von CXCL10 in Monozyten, PMNs iDCs, die mit *A. fumigatus* kokultiviert waren, entdeckten wir im Rahmen dieser Studie eine Induktion von CXCL10 (Monozyten 105 x, iDCs 2.4 x) und eine Proteinexpression (iDCs 14.9 x). Keine Unterschiede wurden bei PMNs gefunden, die mit *A. fumigatus* kokultiviert wurden. Des Weiteren waren in Seren von Patienten, die an IA erkrankt waren, die CXCL10-Spiegel signifikant erhöht verglichen mit Proben von Patienten ohne Entzündungszeichen oder ganz gesunden Menschen. Diese Beobachtung macht die wichtige Rolle von CXCL10 in der Immunabwehr gegen *A. fumigatus* erneut klar. Dieses Gen und insbesondere sein Haplotyp „CGAG“ sollte im Hinblick auf eine frühe Identifikation von Risikopatienten für eine Aspergillose im Auge behalten werden.

IFN- $\gamma$  wird sowohl von CD4<sup>+</sup>-Zellen als auch von natürlichen Killerzellen produziert. Es ist eines der Schlüsselzytokine im Zytokinsturm, der mit der Manifestation und dem Fortschreiten einer akuten GvHD assoziiert wird. Zusammen mit TNF- $\alpha$  wird es als Mediator einer akuten GvHD verstanden. Nach Stammzelltransplantation produziert eine große Zahl an T-Zell-Klonen IFN- $\gamma$ , wobei die IFN- $\gamma$ -Spiegel vor und während der akuten GvHD ansteigen.<sup>277</sup>

Intronische Polymorphismen im IFN- $\gamma$ -Gen (T+874A und G+2109A) korrelieren mit der IFN- $\gamma$ -Produktion. So wurde festgestellt, dass Individuen, die für das T/A-Allel (+874) homozygot sind, ein erhöhtes Risiko haben, an Tuberkulose<sup>278</sup> oder SARS<sup>279</sup> zu erkranken.

Es ist kein Novum, dass Mutationen im IFN- $\gamma$ -Rezeptor 1 (IFNG1) und Interferon- $\gamma$ -Rezeptor 2 (IFNG2) eine kritische Rolle in der Anfälligkeit für mykobakterielle Infektionen spielen.<sup>280, 281</sup>

Verschiedene Studien haben belegt, dass an die 50 % der Patienten, die an einer disseminierten Pilzinfektion erkranken, an einem Gendefekt leiden.<sup>280, 281</sup>

Bei IFNGR1 wurden sowohl exonische als auch intronische Mutationen beschrieben; die meisten von ihnen führen zu einem Verlust der Proteinexpression (rezessiv vererbte Nonsense-Mutation) oder normaler Expression eines dysfunktionellen Proteins (rezessiv vererbte Missense-Mutation).<sup>280, 281</sup>

*Jouanguy et al.*<sup>282</sup> berichteten von einer Gruppe dominant vererbter Nonsense-Mutationen, die in einer Überakkumulation verkürzter IFNGR1-Proteine resultieren. Folglich spielt die Höhe der IFNGR1-Expression wahrscheinlich eine kritische Rolle in der IFN- $\gamma$ -Empfindlichkeit.

Das Zytokin IL-4 wird hauptsächlich von aktivierten T-Zellen, CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, gebildet und ist maßgeblich bei der Proliferation von B-Zellen und Mastzellen beteiligt; darüber hinaus charakterisiert es den Th2-Subtyp. Die Bedeutung von IL-4 in der Transplantationsmedizin wird in der Fähigkeit, die Bildung von potenziell schädlichen Th1-Zellen und somit auch die Entwicklung einer akuten GvHD zu unterdrücken, gesehen.<sup>283, 284,</sup> Th2-Zellen sollen die Spenderorgantoleranz induzieren. So entdeckten *Uboldi de Capei et al.*<sup>285</sup>, dass für CC im SNP -33IL4 (low IL-4 producer) homozygote Patienten mit HLA-Class-I-Mismatch (unabhängig des Matches von Class II) vor einer chronischen Abstoßungsreaktion geschützt sind.

Gleich mehrere Studien belegen die Assoziation zwischen IL-4-Ralpha-Polymorphismen und dem Auftreten von Asthma<sup>286, 287, 288</sup> so konkludierten beispielsweise *Wenzel et al.*<sup>289</sup> kürzlich wieder, dass SNPs in IL-4Ralpha (die Minorallele E375A and Q551R) mit schweren Asthmaexazerbationen, einer schlechteren Lungenfunktion und einer erhöhten Mastzell-bezogenen Gewebsentzündung assoziiert werden können.

*Knutsen et al.*<sup>290</sup> konnten bereits herausfinden, dass das Vorhandensein von IL4Ralpha SNPs, insbesondere ile75val, ein genetischer Risikofaktor für die Entwicklung einer allergischen bronchopulmonalen Aspergillose ist. Des Weiteren vermuteten sie, dass eine erhöhte Sensitivität von IL-4-vermittelten Aktivitäten durch IL-4R-Polymorphismen in Verbindung mit anderen Polymorphismen wie IL-13 und IL-10 kombiniert mit einer HLA-DR2/DR5 Restriktion gegenüber Aspergillusantigenen bei ABPA-Patienten in einer erhöhten B-Zell-Aktivität und einem monozytischen/dendritischen Zellphänotyp, der TH2-Antworten und Aspergillus spezifische TH2-Zellen verändert, resultiert.

IL-10 ist auf Chromosom 1 (1q31-32) lokalisiert und wird primär von Monozyten, TH2-Zellen und Mastzellen, aber auch von Subpopulationen aktivierter T- und B-Zellen produziert.<sup>291</sup>

Es ist ein pleiotropes Zytokin, das sowohl immunsuppressive als auch immunstimulatorische Effekte auf unterschiedliche Zelltypen ausübt. IL-10 ist auch als humaner Zytokinsyntheseinhibitorfaktor (CSIF) bekannt, da es ein Th2-Zytokin ist, das die Produktion von Th1 (IFN- $\gamma$  und IL-2)-Zytokinen hemmt.<sup>291, 292</sup>

IL-10 hat außerdem einen wirksamen Effekt auf Makrophagen einschließlich Downregulierung der MHC-Class II-Expression und co-stimulatorischen Molekülen, die das Vermögen der Makrophagen zur Interaktion mit T- und NK-Zellen einschränken sollen<sup>293-295</sup> und erschwert somit die Erkennung von zytotoxischen Lymphozyten.<sup>296</sup>

Gleichzeitig stimuliert es die Fc $\gamma$ R-Expression derselben Zellen, was bedeutsam in der Vermittlung von ADCC ist.<sup>295, 297</sup>

Darüber hinaus ist IL-10 ein potenter Suppressor der proinflammatorischen Zytokine Prostaglandin E<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und IL-12<sup>293, 294, 298, 299, 316</sup>, trotzdem wirkt es selbst bei der Antikörpersynthese und der Bildung von zytotoxischen T-Zellen mit.<sup>300</sup> Th2-Zellen aktivieren zytotoxische T-Zellen durch die Aktivierung von IL-10 zusammen mit IL-4 und IL-5 und reduzieren so die Produktion inflammatorischer Zytokine.<sup>301</sup>

Zusätzlich induziert IL-10 die Freisetzung löslicher TNF-Rezeptoren und hemmt die Induktion der ICAM- und B7-Genexpression.<sup>293, 294</sup>

IL-10 kann auch die Expression des IL-1-Rezeptorantagonisten antagonisieren, welcher mögliche antiinflammatorische Eigenschaften hat.

IL-10 fördert auch das Überleben der B-Zellen, deren Proliferation, Differenzierung und Antikörperproduktion.<sup>295</sup>

Eine IL-10 abhängige CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Untergruppe, die Tr1-Zellen, sollen eine antigenspezifische Toleranz induzieren können.<sup>302, 303</sup>

Mehrere Studien haben bereits zu der Vermutung angeregt, dass Polymorphismen von IL-10 das Outcome hämatopoetischer Stammzelltransplantationen beeinflussen.<sup>304-309</sup> Wahrscheinlich fördert IL-10 die Toleranzinduktion nach allogener Transplantation<sup>298, 310-315</sup> und vermindert eine durch Lipopolysaccharide und Radiatio induzierte Apoptose.<sup>317</sup>

Die Stärke der Produktion eines Zytokins hängt nicht nur von der Schwere des aktuellen Krankheitsstadiums und dem Vermögen eines Individuums, verschiedene

Zytokine zu bilden, sondern auch von den polymorphen Eigenschaften des das Zytokin kodierenden Gens zusammen.

Nukleotidvariationen können so auch bei IL-10 die Transkription oder Translation, die Sekretion oder Funktion der korrespondierenden Proteine signifikant beeinflussen.

<sup>318, 319</sup> Im IL-10-Promoter wurden drei SNPs auf den Positionen G/A-1082, C/T-819 und C/A-592 bislang eingehender beschrieben, die drei Haplotypen bilden: GCC, ACC und ATA. <sup>318, 320, 321</sup> Diese Haplotypen sind bekannt dafür, einen unterschiedlichen Effekt auf die Transkription des IL-10-Gens zu haben. <sup>320</sup>

Allerdings sind unterschiedliche Assoziationen zwischen IL-10-Produktion und Mikrosatelliten und SNP-Allelen dokumentiert; Assoziationen zwischen Genotyp und Krankheitsprävalenz oder –schwere sind ebenfalls inkonsistent. <sup>320, 323-333</sup>

Es wurde mehrfach berichtet, <sup>320, 331, 358</sup> dass die Substitution von A durch ein G auf Position -1082, was den Haplotyp GCC ergibt, in signifikant höheren IL-10-Spiegeln resultieren soll.

*Keijsers et al.* <sup>332</sup> fanden genau das Gegenteil heraus, nämlich dass das -1082G-Allel oder der GCC-Haplotyp mit einer erniedrigten Produktion von IL-10 assoziiert werden kann. Und *Gibson et al.* <sup>330</sup> bestätigten diese Ergebnisse, nämlich dass der distale Promoterregion AA (-3575/-2763)-Haplotyp mit dem proximalen GCC(-1082/-819/-592)-Promoter-Haplotyp assoziiert werden kann. Sie fanden auch verminderte *in vitro* IL-10-Produktionen bei Patienten mit dem distalen AA-Haplotyp.

*Bunnapradist et al.* <sup>318</sup> machten die Präsenz von Arginin auf Position -1082 (IL-10 1\*A) für eine schwache IL-10-Produktion nach Stimulation von T-Zellen *in vitro* verantwortlich. <sup>318</sup>

*Helminem et al.* <sup>358</sup> setzten den ATA-Haplotypen in Zusammenhang mit einem hohen IL-10-Plasmaspiegel. Sie vermuteten, dass nicht nur die Produktionsrate, sondern auch der Grad der Degradation und die Rezeptorbindung den IL-10-Spiegel beeinflussen. <sup>358</sup>

Das A-Allel des -592 bp SNPs im IL-10-Gen wurde von *Lowe et al.* <sup>359</sup> mit einer schwächer stimulierten IL-10-Freisetzung und einer erhöhten Mortalität bei schwer kranken Intensivpatienten assoziiert. Das C-Allel wiederum konnte mit Überleben und vermehrter IL-Freisetzung assoziiert werden. <sup>359</sup> Sowohl bei Herz- als auch bei

Nierentransplantationen sollen Patienten mit hohem TNF- $\alpha$ - und niedrigem IL-10-Spiegel ein hohes Risiko für eine Transplantatsabstoßung haben.<sup>350, 360-367</sup>

Mehrere Studien haben bereits darauf hingewiesen, dass Zytokine und andere Regulatoren der Immunantwort wahrscheinlich eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der aGvHD spielen.<sup>368, 369, 304</sup>

Da das antiinflammatorische IL-10 TNF- $\alpha$  antagonisiert und damit GvHD reduziert, da TNF- $\alpha$  stark an der Entstehung einer akuten GvHD beteiligt ist<sup>370</sup>, schwächt eine hohe IL-10-Produktionsrate des Empfängers in der frühen Posttransplantationsphase die Intensität der Alloimmunantwort und die GvHD-induzierte Entzündungsreaktion und dadurch die klinischen Manifestationen einer GvHD und die assoziierte Mortalität.<sup>304, 371</sup>

Klinische Studien zeigen, dass erhöhte Plasmakonzentrationen an endogenem IL-10 also mit immunologischer Toleranz assoziiert werden können. *Bacchetta et al.*<sup>372</sup> beispielsweise beobachteten die Assoziation zwischen vermehrter Expression von IL-10 bei Empfängermonozyten und das Ausbleiben einer aGvHD nach dem Erhalt HLA-mismatched fetaler hämatopoetischer Zellen bei Patienten mit schwerer kombinierter Immundefizienz.

So soll bei der Knochenmarkstransplantation eine Präkonditionierung der IL-10-Produktion vor TNF- $\alpha$ -Ausschüttung, akuter GvHD und anderen transplantationsbezogenen Komplikationen schützen.<sup>373</sup> Zellen von Patienten mit akuter oder chronischer GvHD sollen weniger IL-10 produzieren.<sup>374, 375</sup>

Eine erhöhte Anfälligkeit für aGvHD wurde mit IL -10(-1082) G/G polymorphen Allelen, allelischen Varianten in der Promoterregion, die die IL-10-Produktion steuern, assoziiert.<sup>362, 376-383</sup>

Auch Transplantatempfänger mit IL-10(-1064) C/A Mikrosatellit-Allele entwickeln eine schwerere akute GvHD als Patienten aus der Vergleichsgruppe.<sup>370, 305</sup>

Der IL-10(-1082) G/A Polymorphismus A Allel scheint eine niedrigere IL-10-Produktion zu bewirken.<sup>320</sup> In Verbindung mit TNFd3/d3 Genotyp soll es eine Transplantatsabstoßung nach Herztransplantation begünstigen.<sup>334</sup>

*Lin et al.*<sup>304</sup> konnten herausfinden, dass einem spezifischen Promoterregion-Haplotyp ein protektiver Effekt zugeschrieben werden kann. Die niedrigste Inzidenz

einer schweren aGvHD konnten sie dem IL-10-592A/A-Genotyp zuordnen. Des Weiteren zeigten ihre Untersuchungen, dass Empfänger, die homozygot für den TCATA-Haplotyp waren, ein niedrigeres Risiko für eine aGvHD haben als Empfänger die heterozygot waren für TCATA- oder TCACC-Haplotyp oder Empfänger, die homozygot für TCACC-Haplotyp waren. Diese und Daten aus anderen Studien könnten bedeuten, dass der TCATA-Haplotyp definiert ist durch hohe IL-10-Spiegel.

Auch für die Entwicklung einer cGvHD soll ein erniedrigter IL-10-Spiegel verantwortlich sein<sup>292</sup>; während einer extrakorporalen Photopherese als Behandlung einer cGvHD beispielsweise steigt der Spiegel an.<sup>354</sup>

In einem Mäusemodell wurde beobachtet, dass bei Erkrankung an einer cGvHD die Produktion von Th2-Zytokinen gesteigert und die von Th1-Zytokinen vermindert war, was darauf schließen lässt, dass die Aktivierung von Th-2-Zellen verantwortlich ist für die Autoantikörperbildung und die Immunsuppression bei cGvHD.<sup>291</sup>

Der ATA-Haplotyp zeigte in der Studie von *Kim et al.*<sup>301</sup> ein siebenfaches Risiko für die Entwicklung einer cGvHD im Vergleich zum ACC-Haplotyp, woraus man schließen könnte, dass der ACC-Haplotyp eine protektive Rolle spielt. Ähnliche Beobachtungen machten *Mullighan et al.*<sup>384</sup>

Ein Übermaß von Allel 13 des IL-10 (-1064) C/A n-repeat-Polymorphismus taucht auch bei Lupus erythematodes auf.<sup>385</sup> Der IL-10 (-597) C/A –Polymorphismus soll die natürliche Resistenz gegen eine HIV-Viruspenetration im Falle eines akzidentiellen Kontakts beeinflussen.<sup>386</sup>

Der R2GCC-Haplotyp des Spenders konnte mit einem erhöhten Risiko für TRM bei Stammzelltransplantationen vom unverwandten Spender assoziiert werden. Der R3-GCC-Haplotyp hingegen mit einem erniedrigten Risiko.<sup>387</sup>

Unsere Ergebnisse bestätigen die Erkenntnisse von *Seo et al.*<sup>334</sup>, die den Zusammenhang zwischen IL-10 und Aspergillose bereits untersuchten. Sie schrieben dem ACC Haplotypen von IL-10 eine protektive Rolle im Zusammenhang mit invasiver pulmonaler Aspergillose zu. In ihrer Untersuchung reduzierte ein ACC-

Haplotyp das Auftreten einer IPA sogar neunfach. Typ-1-Antwortzytokine wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  sollen eine protektive Rolle spielen. TNF- $\alpha$  ist dafür bekannt, die antifungale Aktivität von polymorphnukleären Neutrophilen und mononukleären Phagozyten gegen *A. fumigatus* zu steigern.<sup>388</sup>

Das Fortschreiten einer IPA wurde mit einer Th2-Antwort assoziiert, in Korrelation zu einem Anstieg der IL-4- und IL-10-Level und einem Absinken des IFN- $\gamma$ -Levels. So supprimierten mit IL-10 vorbehandelte humane Makrophagen die Superoxidproduktion und verminderten den Schaden durch die Hyphen.<sup>334</sup>

*Brouard et al.*<sup>335</sup> fanden heraus, dass der -1082 GG Genotyp im IL-10-Gen für eine Kolonisierung von *A. fumigatus* und die Entwicklung einer ABPA prädestiniert. Dieser Genotyp wurde mit erhöhten IL-10-Plasmaleveln und ebenfalls mit einer erhöhten Veränderung der Th2-Antworten auf Aspergillus assoziiert.

*Roilides et al.*<sup>336</sup> berichteten von einer Korrelation zwischen IL-10-Serumkonzentrationen und IPA-Verläufen bei nicht neutropenischen immunsupprimierten Patienten und bestätigten, dass niedrige IL-10-Konzentrationen einen positiven und hohe IL-10-Konzentrationen einen negativen Effekt ausüben.

Bei der Untersuchung von Genpolymorphismen und dem Auftreten einer HCMV-Reaktivierung oder -Erkrankung fielen 9 Marker als signifikant auf; 5 davon mit p-Werten  $<0.01$  als hoch signifikant. Diese Marker fanden sich im CCR5-Gen, im MCP1-Gen und im IL-10-Gen.

Vier Marker, im MCP1- und IL-10-Gen, zeigten eine signifikante Assoziation mit einer HCMV-DNAämie im Vergleich zu Patienten ohne Reaktivierung - unabhängig von einer HCMV-Erkrankung. Beide Marker des MCP1-Gens, rs1024611 (-2518, C/T) und rs13900 (1543, C/T) haben gleichzeitig eine signifikante Assoziation mit einer HCMV-Reaktivierung. Als einzige Marker in dieser Untersuchung überhaupt, denn weder Marker des CCR5- noch des IL-10-Gens zeigen eine Assoziation mit einer Reaktivierung. So kann man vermuten, dass eine HCMV-Reaktivierung mit SNPs im MCP-1-Gen in Zusammenhang steht.

---

Der Marker rs13900 konnte darüber hinaus sogar noch mit einer zusätzlichen HCMV-Erkrankung ( $p= 0,014$ ) in Verbindung gebracht werden.

Im IL-10-Gen waren zwei Marker hoch signifikant für sowohl eine HCMV-DNAemie als auch für eine HCMV-Erkrankung. Der Marker rs1800896 (-1117, A/G) jeweils mit den p-Werten 0.007 und 0.001, der Marker rs1878672 (2068, C/G) mit den p-Werten 0.010 und 0.003.

Im CCR5-Gen deuten die Marker rs2734648 ( $p= 0.014$ ) und rs1800023 ( $p= 0.011$ ) auf einen Zusammenhang mit einer HCMV-Erkrankung nach bereits erfolgter Reaktivierung hin. Mit einer HCMV-Reaktivierung selbst konnten keine Marker dieses Gens assoziiert werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine HCMV-Reaktivierung wahrscheinlich mit Polymorphismen im MCP-1-Gen zu assoziieren ist, da weder Marker des CCR5- noch des IL-10-Gens mit einer Reaktivierung assoziiert werden können. Bei MCP-1 korrespondierte der niedrigste p-Wert (0.0182) mit der Markerkombination rs1024611 und rs4586 mit einer Odds Ratio von 1.7, was den Risikohaplotyp GC ergab.

Eine HCMV-Erkrankung nach erfolgter HCMV-Reaktivierung könnte mit Polymorphismen im CCR5- und - mehr noch - IL-10-Gen zusammenhängen. Der niedrigste p-Wert (0.0001) einer Markerkombination von IL-10 wurde für die Marker rs3024496, rs1800871 und rs1800893 berechnet. Unter mehreren auffälligen Haplotypen war der häufigste Haplotyp mit erhöhtem Risiko der Haplotyp CGA mit einer Odds Ratio von 1.65. Für das CCR5-Gen ließ sich kein signifikanter Risikohaplotyp berechnen.

Die Haplotypanalyse bestätigte mit p-Werten 0.0026 und 0.0447 den Zusammenhang zwischen HCMV und IL-10 und MCP-1.

CCR5, eigentlich Chemokin (C-C-Motif) Rezeptor 5, ist ein weiterer Chemokinrezeptor. Die Chemokine, die an diesen Rezeptor binden, sind CCL5 (ehemals RANTES), CCL3 und CCL4. CCR5 heißt auch das Gen, das für den CCR5-Rezeptor kodiert. Es ist auf dem kurzen (p) Arm auf Position 21 von

---

Chromosom 3 lokalisiert. CCR wird hauptsächlich auf T-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen und Mikrogliazellen exprimiert.

CCR5-Promoter-Polymorphismen sind bekannt dafür, dass sie eine Assoziation mit HIV- und HCV-Infektionen aufweisen.<sup>337-342</sup>

Der Chemokinrezeptor CCR5 und sein Ligand MCP-1 sind an der Immunantwort und der selektiven Rekrutierung von Lymphozyten in die Leber bei einer HCV-Reaktion beteiligt. CCR5- delta32 wird eine mögliche Rolle bezüglich des Verlaufs einer HCV-Infektion zugeschrieben.<sup>341</sup> Signifikante Assoziationen wurden von *Hellier et al.*<sup>341</sup> zwischen CCR5-delta32 und einer reduzierten Entzündungsreaktion und einer mildereren Fibrose gefunden.

*Chang et al.*<sup>343</sup> untersuchten auch den Einfluss auf HBV. Ihre Ergebnisse zeigen, dass der CCR5 59029A allelische Genotyp mit einem erhöhten Risiko für eine chronische HBV-Infektion in Verbindung gesetzt werden kann. Für eine spontane Clearance spricht die Präsenz des CCR5 59029G Allels.

*O'Brien und Moore* zeigten, dass der Marker rs2734648 (-2554, G/T), der im Promoter von CCR5 liegt, die Progression von AIDS triggert.<sup>345</sup> Wir können dem nun hinzufügen, dass zusätzlich eine Assoziation mit der Anfälligkeit für eine HCMV-Krankheit vorliegt.

Es war also bereits bekannt, dass CCR5-Polymorphismen einen Einfluss auf virale Infektionen wie HIV, HCV und HBV haben; unsere Studie lenkt nun ein weiteres Augenmerk auf CMV.

Bei Transplantatempfängern soll die Präsenz des CCR5Delta32-Allels ein unabhängiger und protektiver Faktor sein, der mit einem erniedrigten Risiko für eine GvHD assoziiert werden kann.<sup>346</sup>

Das Risiko einer akuten Abstoßungsreaktion bei Nierentransplantation könnte mit einer genetischen Variation im Chemokinrezeptorgen CCR5-59029 in Zusammenhang gebracht werden.<sup>347</sup>

MCP-1 ist ein Mitglied der CC-Chemokin-Subfamilie und wird in der Dentition und beim Knochenabbau gefunden. Im Knochen wird MCP-1 von reifen Osteoklasten und Osteoblasten exprimiert und steht unter der Kontrolle des Nuklearfaktors  $\kappa\beta$ . Es induziert die Chemoattraktion von Monozyten, T-Lymphozyten, Eosinophilen und Basophilen; außerdem ist es verantwortlich für mehrere inflammatorische Reaktionen.

Es wurde gezeigt, dass der Promoter Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B hat; NF- $\kappa$ B spielt eine Schlüsselrolle in der Regulierung der Immunantwort in entzündlichen Geschehen, so ist es gut vorstellbar, dass Mutationen in diesem Gen die angeborene Immunität verändern.<sup>348</sup>

Einer in dieser Untersuchung gefundenen signifikanten Marker im MCP-1-Gen (rs1024611, -2518 C/T) ist in dieser Region lokalisiert.

Der Promoterpolymorphismus rs1024611 (MCP1-2518 G>A) zeigte bei *Park et al.*<sup>349</sup> eine deutliche Assoziation mit der Clearance einer HBV-Infektion. Die Frequenz von Homozygoten für das MCP1-2518A Allel (MCP1-2518A/A) bei Trägern eines chronischen Hepatitis B-Virus war signifikant höher als die unter spontan geheilten Patienten.

Eine vermehrte Expression von MCP-1 wurde bei Abstoßungsreaktionen von Nierentransplantaten, Koronararterienkrankungen und Myokardinfarkten nachgewiesen.<sup>350-353</sup> *Kruger et al.*<sup>352</sup> fanden ein erhöhtes Risiko für frühes Nierentransplantatversagen bei Empfängern renaler Transplantate, die homozygot für die -2518G Mutation im MCP1-Gen sind. Mononukleären Zellen von Nierentransplantatempfängern, die die G-Allele trugen, wurde eine zweieinhalb so große MCP1-Sekretion zugeschrieben.

Die genetische Determination einer Überproduktion von MCP-1 zeigte bei Untersuchungen von *Lacha et al.*<sup>350</sup> eine signifikant schlechtere Funktion von Spendernieren nach Nierentransplantation. Ihre Patienten mit dem RANTES-109 TT-Allel zeigten außerdem eine schlechtere Nierenfunktion nach einem Jahr im Vergleich mit Patienten mit RANTES-109 TC-Allel.

Humanes und murines IL-10 sind hoch homolog mit dem EBV-BCRF-1-Gen, das in viral-IL-10 bzw. vIL-10 umbenannt wurde.<sup>354</sup>

Die Polymorphismen des IL-10-Gens wurden mit der Resistenz gegenüber manchen bekannten Herpesviren und der Regulation und Schwere einer Infektion im Reaktivierungsprozess bereits assoziiert.<sup>355</sup>

Die Daten von *Helminem et al.*<sup>356</sup> zeigen, dass der Promoterpolymorphismus auf Position -1082 (high-producer-Allel (G) oder das low-producer-Allel (A)) von IL-10 mit einer Suszeptibilität und Schwere einer EBV-Infektion assoziiert werden kann. *Wu et al.*<sup>389</sup> stellten fest, dass die Frequenz des high-producer-Allels (-1082G) signifikant höher war bei EBV-negativen Patienten mit Magenkarzinom im Vergleich zur EBV-positiven Kontrollgruppe.

Die Betrachtung der Ergebnisse von *Hurme et al.*<sup>355</sup> führen zu dem Schluss, dass bei CMV-negativen Individuen die Häufigkeit von ACC erhöht und die von GCC erniedrigt ist und bei EBV-Patienten das direkte Gegenteil vorliegt. Bei der Resistenz gegen HSV scheinen die Haplotypen GCC und ACC sogar gar keine Rolle zu spielen.

Träger des ATA-Haplotyps sollen nach *Haanpää et al.*<sup>357</sup> überrepräsentiert bei Patienten mit Herpes zoster sein.

Obwohl *Helminem et al.*<sup>358</sup> das Gegenteil behaupten, siehe oben, assoziieren *Turner et al.*<sup>320</sup> den ATA-Haplotyp mit einer niedrigen Produktionsrate von IL-10 und folgern daraus, dass die erhöhten Produktionsraten der proinflammatorischen Zytokine für die Schwere und Reaktivierung ruhender Herpesviren wie VZV, CMV und HSC verantwortlich sind.<sup>355, 389, 390</sup>

Die signifikanten Assoziationen der in dieser Arbeit untersuchten SNPs mit der Entwicklung einer HCMV-Krankheit fanden sich auf Positionen zwischen -1117 (rs1800896), 1668 (rs3024492) und 2068 (rs1878672).

Es ist sehr interessant, dass wir genau jene Gene als Risikogene für HCMV analysierten, die bereits als Zielgene von HCMV bekannt waren. Das Genom von HCMV beinhaltet ein Gen, welches für ein IL-10-Homologon (CMV-IL-10) kodiert. Dieses Homologon inhibiert die Proliferation von PBMC in gleichem Maße wie das menschliche IL-10 und ist zudem in der Lage die Zytokinproduktion von Monozyten einzuschränken, sowie die Expression von MHC-Class-I- und MHC-Class-II-Molekülen zu vermindern.<sup>393</sup>

Des Weiteren kodiert HCMV für vier virale Chemokinrezeptoren, die eine Sequenzhomologie mit humanen Chemokinrezeptoren aufweisen. Diese ermöglichen die Depletion von Chemokinen wie z.B. des Rezeptors, der MCP-1 mit hoher Affinität bindet.<sup>394</sup>

Schließlich reduziert die Downregulierung der Expression von CCR5 auf der Zelloberfläche die Migration verschiedener Immuneffektorzellen in Richtung der Entzündungsherde.<sup>395</sup>

Diese drei Punkte erläutern den Zusammenhang zwischen HCMV-vermittelter Manipulation der Aktivitäten von IL-10, MCP-1 und CCR5 und seinem Vermögen, der menschlichen Immunabwehr zu entgehen.

Die Analyse der klinischen Parameter zeigte eine Assoziation zwischen CD34<sup>+</sup>-Selektion und einer HCMV-Reaktivierung ( $p= 0.037$ ) und einer HCMV-Erkrankung ( $p= 0.001$ ). Die Gabe von CD34<sup>+</sup>-Zellen vor Transplantation führt zu einer verzögerten Immunrekonstitution, da die Depletion von B- und T-Zellen im Transplantat parallel erfolgt. Eine schwere akute GvHD konnte ebenso signifikant mit einer HCMV-Krankheit assoziiert werden. Eine chronische GvHD zeigte allerdings nur eine nennenswerte Assoziation im Vergleich HCMV-Reaktivierung: HCMV-Erkrankung ( $p= 0.034$ ). Die Behandlung mit Kortikosteroiden führte zu einer Zunahme an HCMV-Reaktivierungen.

Die Entdeckung einer steigenden Anzahl von Genpolymorphismen liefert uns eine mögliche Erklärung für die merkliche Variabilität in den klinischen Ergebnissen bei Transplantationspatienten.

Obwohl unsere und auch andere Studien die Bedeutung bestimmter SNPs andeuten, sind die Ergebnisse doch leider nicht beweiskräftig. Momentan ist es noch etwas verfrüht, eine Spender- oder Empfängergenotypisierung dazu zu nutzen, die Transplantationsergebnisse vorauszusagen oder eine immunsuppressive Therapie zu individualisieren. Es ist wahrscheinlich auch davon auszugehen, dass diese Genpolymorphismen selbst nicht ursächlich wirken, sondern eine Verknüpfung mit einem noch unbekanntem, aber kausal relevanten Gen bzw. Genprodukt besteht.

Es ist eher davon auszugehen, dass bei Krankheiten wie Bluthochdruck oder Diabetes ein individueller Risikostatus durch ein komplexes genetisches Merkmal, das aus dem Zusammenspiel mehrerer Gene resultiert, festgestellt werden kann, als dass dies durch ein einzelnes Gen geschähe.

Weitaus umfangreichere Studien mit größeren Patientenzahlen werden es uns ermöglichen, den Effekt der Kombination von Polymorphismen zu untersuchen. Die Korrelation zwischen allelischen Assoziationen und funktionalen Effekten wird ebenso ein wichtiger Schritt in künftigen Untersuchungen sein.

Vorteile solcher Technologien wie der Identifikation von SNPs deuten darauf hin, dass es zukünftig möglich sein wird, die Typisierung von Patienten auf breiter Basis auf multiple Polymorphismen durchzuführen und dies dadurch klinisch einsetzbar zu machen.

Die Identifizierung von genetischen Determinanten bietet uns die Möglichkeit, nicht nur ein immunsuppressives Protokoll für jedes Individuum Maß zu schneidern, sondern auch Pathomechanismen zu definieren und neue therapeutische Angriffspunkte zu identifizieren.

Die Genforschung, sowie die Erstellung, Fortführung und Nutzung von genetischen Datenbanken werden daher künftig wichtige Katalysatoren sein, um bedeutende Fortschritte bei der Entdeckung, Entwicklung und Anwendung neuartiger Medikamente erzielen zu können.

Es ist zu erwarten, dass diese einen bedeutenden Fortschritt für die Behandlung, Heilung und Prävention dieser Krankheiten bedeuten werden.

**ZUSAMMENFASSUNG**

Für Aspergillose konnte eine starke Assoziation mit einem p-Wert von 0.004 berechnet werden. Hierbei handelt es sich um den klinischen Risikofaktor „respiratorische Virusinfektionen“.

Die genetische Analyse brachte 7 signifikante Marker hervor, wovon 4 als hoch signifikant bewertet werden können; 3 davon befinden sich im CXCL10-Gen (rs1554013, C/T; rs3921, C/G; rs4257674, A/G), darunter auch derjenige mit dem niedrigsten errechneten Wert  $p=0.001$  (rs4257674), einer im IFN- $\mu$ -Gen (rs2069705, C/T). Eine Haplotypanalyse der Marker rs1554013 (C/T), rs3921 (C/G), rs4859588 (A/G) und rs4257674 (A/G) bestätigte die Single-Marker-Analyse und identifizierte „CGAG“ als High-risk-Haplotyp ( $p=0.008$ ).

Bei der Untersuchung von Genpolymorphismen und dem Auftreten einer HCMV-Reaktivierung oder –Erkrankung fielen 9 Marker als signifikant auf; 5 davon mit p-Werten  $<0.01$  als hoch signifikant. Diese Marker fanden sich im CCR5-Gen (rs1800023, -2086, A/G), im MCP-1-Gen (rs13900, -1543, C/T) und im IL-10-Gen (rs1800893, -1387, A/G), rs1800896, -1117 (A/G) und rs1878672, -2068 (C/G).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine HCMV-Reaktivierung wahrscheinlich mit Polymorphismen im MCP-1-Gen assoziiert werden kann, da weder Marker des CCR5- noch des IL10-Gens mit einer Reaktivierung assoziiert werden können. Bei MCP-1 korrespondierte der niedrigste p-Wert (0.0182) mit der Markerkombination rs1024611 und rs4586 mit einer Odds Ratio von 1.7, was den Risikotyp GC ergab.

Eine HCMV-Erkrankung nach erfolgter HCMV-Reaktivierung kann nach den berechneten Werten dieser Untersuchung mit Polymorphismen im CCR5- und IL-10-Gen in Verbindung gebracht werden. Der niedrigste p-Wert (0.0001) einer Markerkombination von IL-10 wurde für die Marker rs3024496, rs1800871 und rs1800893 berechnet. Unter mehreren auffälligen Haplotypen war der häufigste Haplotyp mit erhöhtem Risiko der Haplotyp CGA mit einer Odds Ratio von 1.65.

Die Analyse der klinischen Parameter zeigte eine Assoziation zwischen CD34<sup>+</sup>-Selektion und einer HCMV-Reaktivierung ( $p=0.037$ ) und einer HCMV-Erkrankung

( $p=0.001$ ), sowie eine Assoziation zwischen einer schweren akuten GvHD und der Gabe von Kortikosteroiden mit einer HCMV-Krankheit.

Diese Arbeit bestätigt teilweise die Ergebnisse vieler anderer Studien bezüglich des Einflusses klinischer Risikofaktoren auf die Entwicklung einer Aspergillose oder einer CMV-Erkrankung.

Die Analyse der Genpolymorphismen von Zytokinen und Zytokinrezeptoren lieferte neue, interessante Ergebnisse. Es wäre sicherlich lohnenswert, weitaus umfangreichere Studien mit größeren Patientenzahlen durchzuführen, um die Ergebnisse dieser Arbeit zu bestätigen. Ziel wird sein, Typisierungen von Patienten auf breiter Basis auf multiple Polymorphismen durchzuführen, um individuelle immunsuppressive Protokolle entwerfen zu können. Derartige therapeutische Ansätze würden einen bedeutenden Fortschritt in Behandlung, Heilung und Prävention der Aspergillose und CMV-Erkrankung bedeuten.

---

**ANHANG****1 LITERATURVERZEICHNIS**

1. The International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms.. Nature 409, 928-933 (15 February 2001)
2. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, Oksenberg J, McNicholl J, Pociot F, Hardt C, D'Alfano S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 1. Genes Immun. 2001 Apr;2(2):61-70. Review.
3. Tang K, Thornton KR, Stoneking M. A New Approach for Using Genome Scans to Detect Recent Positive Selection in the Human Genome. PLoS Biol. 2007 Jun 19;5(7):e171 [
4. Stoneking M. Single nucleotide polymorphisms: From the evolutionary past... Nature 2001;409;821-822
5. Chakravarti A. Single nucleotide polymorphisms: ...to a future of genetic medicine. Nature.2003;409;822-823
6. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE, Cole CG, Coggill PC, Rice CM, Ning Z, Rogers J, Kwok BP-Y, Mardis ER, Yeh RT, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier LD, Waterston RH, McPherson JD, Gilman B, Schaffner S, Van Etten WJ, Reich D, Higgins J, Daly MJ, Blumenstiel B, Baldwin J, Stange-Thomann N, Zody M C, Linton L, Lander ES, Altshuler D. The International SNP Map Working Group.Nature.2001;409;928-933
7. Chakravarti A. Population genetics--making sense out of sequence. Nature Genet.1999;21;51-60
8. Halushka, MK et al. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. Nature Genet.1999;22;239-247
9. Cargill M et al. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. Nature Genet.1999;22;231-238
10. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. Science 1996;273;1516-1517
11. Lander ES. The new genomics: global views of biology. Science1996;274;536-539
12. Collins FS, Guyer MS, Chakravarti A. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. Science1997;278;1580-1581
13. Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. Nat Rev Genet. 2002 May;3(5):391-7.
14. Hill A. Principles of Medical Statistics. The Lancet, 1937.
15. Einsele H, Bertz H, Beyer J, Kiehl M, Runde V, Kolb H-J, Holler E, Beck R, Schwerdfeger R, Schumacher U, Hebart H, Martin H, Kienast J, Ullmann A, Maschmeyer G, Krüger W, Niederwieser D, Link H, Schmidt C, Oettle H, Kliengebiel T. Infectious complications after allogeneic stem cell transplantation: epidemiology and interventional therapy strategies. Ann Hematol. 2003;82;175-185
16. Hiddemann W, Maschmeyer G, Link H, Helmerking M, Adam D (1997)

- Therapy of infections in patients with acute leukaemia. *Med Klin* 92:406-409
17. Schimpff SC. Empiric antibiotic therapy for granulocytopenic cancer patients. *Am J Med*. 1986;80:13-20
  18. Huges WT, Armstrong D, Bodey GP, et al. 2002 Guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis*. 2002;34:730-751
  19. Buchheidt D, Bohme A, Cornely OA, Fatkenheuer G, Fuhr HG, Heussel G, Junghanss C, Karthaus M, Kellner O, Kern WV, Schiel X, Sezer O, Sudhoff T, Szelenyi H; Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). Diagnosis and treatment of documented infections in neutropenic patients - recommendations of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). *Ann Hematol*. 2003 Oct;82 Suppl 2:S127-32. Epub 2003 Sep 9.
  20. Bodey GP, Buckley M, Sathe YS, Freireich EJ. Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukaemia. *Ann Intern Med* 1966;64:328-340
  21. Ninin E, Milpied N, Moreau P, Andre-Richet B, Morineau N, Mahe B, Vigier M, Imbert BM, Morin O, Harousseau JL, Richet H. Longitudinal study of bacterial, viral, and fungal infections in adult recipients of bone marrow transplants. *Clin Infect Dis*. 2001 Jul 1;33(1):41-7. Epub 2001 May 23.
  22. Crawford J, Dale DC, Lyman GH. Chemotherapy-induced Neutropenia. *Cancer* 2004;100:228-237.
  23. Fätkenheuer G, Buchheidt D, Cornely OA, Fuhr HG, Karthaus M, Kiro J, Leithäuser M, Salwender H, Südhoff T, Szelenyi H (2003) Central venous catheter (CVC)-related infections in neutropenic patients. *Ann Hematol* 82 (Suppl 2) DOI 10.1007/s00277-003-0769-z
  24. Gorschlüter M, Glasmacher A, Hahn C, Leutner C, Marklein G, Remig J, Schmidt-Wolf IG, Sauerbruch T (2001) Severe abdominal infections in neutropenic patients. *Cancer Invest* 19:669-677
  25. Griffith SJ, Nathan C, Selander RK, et al. The epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in oncology patients in a general hospital. *J Infect Dis* 1989;160:1030-6.
  26. Chirletti P, Bacillari P, Sammartino P, Cardi M, Caronna R, Arcese W, Petti C, Stipa V (1993) The surgical choice in neutropenic patients with hematological disorders and acute abdominal complications. *Leuk Lymphoma* 9:237-241
  27. Klastersky J. Science and pragmatism in the treatment and prevention of neutropenic infection. *J Antimicrob Chemother*. 1998;41 (Suppl D):13-24
  28. Viscoli C, Castagnola E. Treatment of febrile neutropenia: what is new? *Curr Opin Infect Dis* 15:377-382
  29. De Pauw B, Meunier F. Infection in patients with acute leukaemia and lymphoma. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000.pp.3090-3102.
  30. Viscoli C, Castagnola E. Factors predisposing cancer patients to infections. *Cancer Treat Res* 1995;79:1-30
  31. Roghman M, Ball K, Erdman D, Lovchik J, Anderson LJ, Edelman R. Active surveillance for respiratory virus infections in adults who have undergone bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2003;32:1085-1088
  32. Franke-Ullmann G, Pfortner C, Walter P, et al. Alteration of pulmonary

- macrophage function by respiratory syncytial virus infection in vitro. *J Immunol.* 1995;154;268-280
33. Wald A, Leisenring W, van Burik JA, Bowden RA. Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 1997;175:1459-66.
  34. Yuen KY, Woo PCY, Ip MSM, et al. Stage-specific manifestation of mold infections in bone marrow transplant recipients: risk factors and clinical significance of positive concentrated smears. *Clin Infect Dis* 1997;25:37-42.
  35. Einsele H, Hebart H. Cellular immunity to viral and fungal antigens after stem cell transplantation. *Curr Opin in Hematology* 2002;9:485-489
  36. Metzner B, Gruneisl R, Gebauer W, Reschke D, Ost E, Muller TH, Reichert D, Rosien B, Del Valle F, Zirpel I, Kohse KP, Schunter F, Illiger HJ. [Late infectious complications after high-dose therapy and autologous blood stem cell transplantation] *Med Klin (Munich)*. 2002 Nov 15;97(11):650-8.
  37. Nichols W, Corey L, Gooley T, Davis C, Boeckh M. High risk of death due to bacterial and fungal infection among CMV seroponegative recipients of stem cell transplantation from seropositive donors (D+/R-): evidence for "Indirect" effects of primary CMV infection. *J Infect Dis.* 2002;185;273-282
  38. Ruhnke M, Böhme A, Buchheidt D, Donhuijsen K, Einsele H, Enzenberger R, Glasmacher A, Gümbel H, Heussel C-P, Karthaus M, Lambrecht E, Südhoff T, Szelényi H. Diagnosis of invasive fungal infections in haematology and oncology. *Ann Hematol* 2003;82 (Suppl 2);141-148
  39. Offner F, Cordonnier C, Ljungman P, Prentice HG, Engelhard D, De Bacquer D, Meunier F, De Pauw B. Impact of Previous *Aspergillus* on the Outcome of Bone Marrow Transplantation. *CID*1998;26;1098-103
  40. Wald A, Leisenring W, van Burik JA, Bowden RA. Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 1997;175;1459-66
  41. Von Eiff M, Suhlsdorf M, Roos N, Hesse M, Schlten R, van de Loo J. Pulmonary fungal infections in patients with hematological malignancies – diagnostic approaches. *Ann Hematol* 1995;70;135-41
  42. Aisner J, Wiernik PH, Schimpff SC. Treatment of invasive aspergillosis: relation of early diagnosis and treatment to response. *Ann Intern Med* 1977;86;539-43
  43. Burch PA, Karp JE, Merz WG, Kuhlman JE, Fishman EK. Favourable outcome of invasive aspergillosis in patients with acute leukemia. *J Clin Oncol* 1987;5;1985-93
  44. Jantunen E, Anttila V-J, Ruutu T. *Aspergillus* infections in allogeneic stem cell transplant recipients: have we made any progress? *Bone Marrow Transplant.* 2002;30;925-29
  45. Denning DW, Marinus A, Cohen J, Spence D, Herbrecht R, Pagano L, Kibbler C, Krcmery V, Offner F, Cordonnier C, Jehn U, Ellis M, Collette L, Sylvester R. An EORTC multicentre prospective survey of invasive aspergillosis in haematological patients: diagnosis and therapeutic outcome. EORTC Invasive Fungal Infections Cooperative Group. *J Infect.* 1998 Sep;37(2):173-80.
  46. Willinger B, Aspöck C. [Hospital infection caused by *Aspergillus*--an overview of etiology and possibilities for prevention] *Wien Klin Wochenschr.* 1998 Jun 5;110(11):388-92. Review. German.
  47. Herbrecht R, Waller J, Koenig H, Boussuge-Widehem V, Dufour P, Lioure B, Maloisel F. [Invasive aspergillosis in immunocompromised patients. An analysis of 57 patients] *Agressologie.* 1992;33 Spec No 2:81-3.

48. Severens JL, Donnelly JP, Meis JF, De Vries Robbe PF, De Pauw BE, Verweij PE. Two strategies for managing invasive aspergillosis: a decision analysis. *Clin Infect Dis*. 1997 Nov;25(5):1148-54.
49. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. 1999. Apr;12(2):310-50. Review.
50. Garrett DO, Jochimsen E, Jarvis W. Invasive *Aspergillus* spp infections in rheumatology patients. *J Rheumatol*. 1999 Jan;26(1):146-9.
51. Lortholary O, Dupont B. Antifungal prophylaxis during neutropenia and immunodeficiency. *lin Microbiol Rev*. 1997 Jul;10(3):477-504. Review.
52. Loo VG, Bertrand C, Dixon C, Vitye D, DeSalis B, McLean AP, Brox A, Robson HG. Control of construction-associated nosocomial aspergillosis in an antiquated hematology unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1996 Jun;17(6):360-4.
53. Maschmeyer G, Noskin GA, Ribaud P, Sepkowitz KA. Changing patterns of infections and antimicrobial susceptibilities. *Oncology (Williston Park)*. 2000 Aug;14(8 Suppl 6):9-16. Review.
54. Kullberg BJ, de Pauw BE. Therapy of invasive fungal infections. *Neth J Med*. 1999 Sep;55(3):118-27. Review.
55. Fancello A, Anghinoni M, Tullio A. [Aspergillus-induced maxillary sinusitis] *Minerva Stomatol*. 1998 Jan-Feb;47(1-2):51-6.
56. Andresen J, Nygaard EA, Stordal K. Primary cutaneous aspergillosis (PCA)--a case report. *Acta Paediatr*. 2005 Jun;94(6):761-2.
57. Groll AH, Ritter J, Muller FM. [Prevention of fungal infections in children and adolescents with cancer] *Klin Padiatr*. 2001 Sep;213 Suppl 1:A50-68. Review.
58. Martino R, Subirà M. Invasive fungal infections in hematology: new trends. *Ann Hematol*. 2002 May;81(5):233-43.
59. Judson MA. Noninvasive *Aspergillus* pulmonary disease. *Semin Respir Crit Care Med*. 2004 Apr;25(2):203-19.
60. Reichenberger F, Habicht JM, Gratwohl A, Tamm M. Diagnosis and treatment of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients. *Eur Respir J*. 2002 Apr;19(4):743-55. Review.
61. Wiederhold NP, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies. *Pharmacotherapy*. 2003 Dec;23(12):1592-610.
62. Stevens DA, Kan VL, Judson MA, Morrison VA, Dummer S, Denning DW, Bennett JE, Walsh TJ, Patterson TF, Pankey GA. Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. *Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis*. 2000 Apr;30(4):696-709.
63. Buckingham SJ, Hansell DM. *Aspergillus* in the lung: diverse and coincident forms. *Eur Radiol*. 2003 Aug;13(8):1786-800.
64. Nicholson WJ, Slight J, Donaldson K. Inhibition of the transcription factors NF-kappa B and AP-1 underlies loss of cytokine gene expression in rat alveolar macrophages treated with a diffusible product from the spores of *Aspergillus fumigatus*. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996 Jul;15(1):88-96.
65. Duong M, Ouellet N, Simard M, Bergeron Y, Olivier M, Bergeron MG. Kinetic study of host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus* in steroid-induced immunosuppressed mice. *J Infect Dis*. 1998 Nov;178(5):1472-82.
66. Kontoyiannis DP, Bodey GP. Invasive aspergillosis in 2002: an update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002 Mar;21(3):161-72.
67. Stanzani M, Orciuolo E, Lewis R, Kontoyiannis DP, Martins SL, St John LS, Komanduri KV. *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune

- response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. *Blood*. 2005 Mar 15;105(6):2258-65. Epub 2004 Nov 16.
68. Gratwohl A, Baldomero H, Passweg J, Frassoni F, Niederwieser D, Schmitz N, Urbano-Ispizua A. Hematopoietic stem cell transplantation for haematological malignancies in Europe. *Leukemia* 2003;17;941-959
  69. Kojima R, Tateishi U, Kami M, Murashige N, Nannya Y, Kusumi E, Sakai M, Tanaka Y, Kanda Y, Mori S, Chiba S, Kusumoto M, Miyakoshi S, Hirai H, Taniguchi S, Sakamaki H, Takaue Y. Chest computed tomography of late invasive aspergillosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005 Jul;11(7):506-11.
  70. Reiffers J, Labopin M, Sanz M, Korbling M, Blaise D, De La Rubia J, Gorin NC. Autologous blood cell vs marrow transplantation for acute myeloid leukemia in complete remission: an EBMT retrospective analysis. *Bone Marrow Transplant*. 2000 Jun;25(11):1115-9.
  71. Oehler VG, Radich JP, Storer B, Blume KG, Chauncey T, Clift R, Snyder DS, Forman SJ, Flowers ME, Martin P, Guthrie KA, Negrin RS, Appelbaum FR, Bensinger W. Randomized trial of allogeneic related bone marrow transplantation versus peripheral blood stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005 Feb;11(2):85-92.
  72. Martino R, Subirá M, Rovira M, Solano C, Vázquez L, Sanz GF, Urbano-Ispizua A, Brunet S, de la Cámara R. Invasive fungal infections after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: incidence and risk factors in 395 patients. *Br J Haematol*. 2002;116;475-482
  73. Wald A, Leisenring W, van Burik JA, Bowden RA. Epidemiology of Aspergillus infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *J Infect Dis*. 1997 Jun;175(6):1459-66.
  74. Champlin R, Khouri I, Shimoni A, Gajewski J, Kornblau S, Molldrem J, Ueno N, Giralt S, Anderlini P. Harnessing graft-versus-malignancy: non-myeloablative preparative regimens for allogeneic haematopoietic transplantation, an evolving strategy for adoptive immunotherapy. *Br J Haematol*. 2000 Oct;111(1):18-29. Review.
  75. Subirà M, Martino R, Rovira M, Vazquez L, Serrano D, De la Cámara R. Clinical applicability of the new EORTC/MSG classification for invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies and autopsy-confirmed invasive aspergillosis. *Ann Hematol* 2002;82;80-82
  76. Subira M, Martino R, Rovira M, Vazquez L, Serrano D, De La Camara R. Clinical applicability of the new EORTC/MSG classification for invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies and autopsy-confirmed invasive aspergillosis. *Ann Hematol*. 2003 Feb;82(2):80-2
  77. Sulahian A, Boutboul F, Ribaud P, Leblanc T, Lacroix C, Derouin F. Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric haematology units during a 4-year prospective study. *Cancer* 2001;91;311-8
  78. Cordonnier C, Escudier E, Verra F, Brochard L, Bernaudin JF, Fleury-Feith J: Bronchoalveolar lavage during neutropenic episodes: diagnostic yield and cellular pattern. *Eur Respir J* 1994;7;114-20
  79. Reichenberger F, Habicht J, Kaim A, Dalquen P, Bernet F, Schlapfer R, et al. Lung resection for invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients with hematologic diseases. *Am J Resp Crit Care Med* 1998;158;885-90
  80. Caillot D, Couaillier JF, Bernard A, Casanovas O, Denning DW, Mannone L, et

- al. Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia. *J Clin Oncol* 2001;19:253-9
81. Van't Wout JW, Van Dissel JT. Fungal Infection in hemato-oncologic patients: better to prevent than to treat. *Blood* 2004;103(4):1182
  82. Drago F, Aragone MG, Lugani C, Rebora A. Cytomegalovirus infection in normal and immunocompromised humans. A review. *Dermatology*. 2000;200(3):189-95.
  83. Tegtmeier GE. Posttransfusion cytomegalovirus infections. *Arch Pathol Lab Med*. 1989 Mar;113(3):236-45. Review.
  84. Mandell GL et al. (editors) (1995) *Principle and Practice of Infectious Diseases*. Fourth Edition. Churchill Livingstone. New York.
  85. de Jong MD, Galasso GJ, Gazzard B, Griffiths PD, Jabs DA, Kern ER, Spector SA. Summary of the II International Symposium on Cytomegalovirus. *Antiviral Res*. 1998 Oct;39(3):141-62.
  86. Hebart H, Brugger W, Grigoleit U, et al.: Risk for cytomegalovirus disease in patients receiving polymerase chain reaction-based preemptive antiviral therapy after allogeneic stem cell transplantation depends on transplantation modality. *Blood* 2001, 97:2183-2185
  87. Cwynarski K, Ainsworth J, Cobbold M, et al.: Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation modality. *Blood* 2001, 97:2183-2185.
  88. Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED. Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. *J Infect Dis*. 1986 Mar;153(3):478-88
  89. Aspin MM, Gallez-Hawkins GM, Giugni TD, Tegtmeier B, Lang DJ, Schmidt GM, Forman SJ, Zaia JA. Comparison of plasma PCR and bronchoalveolar lavage fluid culture for detection of cytomegalovirus infection in adult bone marrow transplant recipients. *J Clin Microbiol*. 1994 Sep;32(9):2266-9
  90. Bacigalupo A, Tedone E, Isaza A, Soracco M, Van Lint MT, Sanna A, Frassoni F, Occhini D, Gualandi F, Lamparelli T, et al. CMV-antigenemia after allogeneic bone marrow transplantation: correlation of CMV-antigen positive cell numbers with transplant-related mortality. *Bone Marrow Transplant*. 1995 Jul;16(1):155-61
  91. Couriel D, Canosa J, Engler H, Collins A, Dunbar C, Barrett AJ. Early reactivation of cytomegalovirus and high risk of interstitial pneumonitis following T-depleted BMT for adults with hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant*. 1996 Aug;18(2):347-53
  92. Broers AE, van Der Holt R, van Esser JW, Gratama JW, Henzen-Logmans S, Kuenen-Boumeester V, Lowenberg B, Cornelissen JJ. 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*. 2000 Apr 1;95(7):2240-5
  93. Trenscher R, Ross S, Husing J, Ottinger H, Elmaagacli A, Roggendorf M, Schaefer UW, Runde V. Reduced risk of persisting cytomegalovirus pp65 antigenemia and cytomegalovirus interstitial pneumonia following allogeneic PBSCT. *Bone Marrow Transplant*. 2000 Mar;25(6):665-72
  94. Hertenstein B, Hampl W, Bunjes D, Wiesneth M, Duncker C, Koszinowski U, Heimpel H, Arnold R, Mertens T. In vivo/ex vivo T cell depletion for GVHD prophylaxis influences onset and course of active cytomegalovirus infection and disease after BMT. *Bone Marrow Transplant*. 1995 Mar;15(3):387-93

95. Gilbert GL, Hayes K, Hudson IL, James J. Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infection in infants by blood filtration to remove leucocytes. Neonatal Cytomegalovirus Infection Study Group. *Lancet*. 1989 Jun 3;1(8649):1228-31
96. Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED. Nonbacterial pneumonia after allogeneic marrow transplantation: a review of ten years' experience. *Rev Infect Dis*. 1982 Nov-Dec;4(6):1119-32
97. Boeckh M. Current antiviral strategies for controlling cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: prevention and therapy. *Transpl Infect Dis*. 1999 Sep;1(3):165-78
98. Nichols WG, Corey L, Gooley T, Davis C, Boeckh M. High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *J Infect Dis*. 2002 Feb 1;185(3):273-82
99. Einsele H, Hebart H, Kauffmann-Schneider C et al. Risk factors for treatment failures in patients receiving PCR-based pre-emptive therapy for CMV infection. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25:757-763
100. Ljungman P. Prevention and treatment of viral infections in stem cell transplant recipients. *Br J haematol* 2002; 118:44-57
101. Ljungman P, Deliliers GL, Platzbecker U et al. Cidofovir for cytomegalovirus infection and disease in allogeneic stem cell transplant recipients. The Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 2001; 97:388-392
102. Li CR, Greenberg PD, Gilbert MJ et al. Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood* 1994; 83:1971-1979
103. Nguyen Q, Champlin R, Giralt S et al. Late cytomegalovirus pneumonia in adult allogeneic blood and marrow recipients. *Clin Infect Dis* 1999;28:618-623
104. Cwynarski K, Ainsworth J, Cobbold M et al. Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2001; 97:1232-1240
105. Einsele H, Rossnek E, Rufer N et al. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 2002 ;95:2240-2245
106. Spencer A, Szydlo RM, Brookes PA, Kaminski E, Rule S, van Rhee F, Ward KN, Hale G, Waldmann H, Hows JM, et al. Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia with volunteer unrelated donors using ex vivo or in vivo T-cell depletion: major prognostic impact of HLA class I identity between donor and recipient. *Blood*. 1995 Nov 1;86(9):3590-7
107. Nguyen Q, Champlin R, Giralt S, Rolston K, Raad I, Jacobson K, Ippoliti C, Hecht D, Tarrand J, Luna M, Whimbey E. Late cytomegalovirus pneumonia in adult allogeneic blood and marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 1999 Mar;28(3):618-23.
108. Meyers JD. Prevention of cytomegalovirus infection after marrow transplantation. *Rev Infect Dis*. 1989 Nov-Dec;11 Suppl 7:S1691-705.
109. Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED. Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. *J Infect Dis*. 1986 Mar;153(3):478-88.
110. Klein M, Schoppel K, Amvrossiadis N, Mach M. Strain-specific neutralization of

- human cytomegalovirus isolates by human sera. *J Virol.* 1999 Feb;73(2):878-86.
111. Fine PE, Adelstein AM, Snowman J, Clarkson JA, Evans SM. Long term effects of exposure to viral infections in utero. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1985 Feb 16;290(6467):509-11.
  112. van der Meer JT, Drew WL, Bowden RA, Galasso GJ, Griffiths PD, Jabs DA, Katlama C, Spector SA, Whitley RJ. Summary of the International Consensus Symposium on Advances in the Diagnosis, Treatment and Prophylaxis and Cytomegalovirus Infection. *Antiviral Res.* 1996 Nov;32(3):119-40.
  113. Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med.* 1998 Jun 11;338(24):1741-51.
  114. Petz LD, Swisher SN (editors) (1996). *Clinical Practice of Transfusion Medicine.* Third Edition. Churchill Livingstone. New York.
  115. Taylor-Wiedeman J, Sissons JG, Borysiewicz LK, Sinclair JH. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol.* 1991 Sep;72 ( Pt 9):2059-64.
  116. Movassagh M, Gozlan J, Senechal B, Baillou C, Petit JC, Lemoine FM. Direct infection of CD34+ progenitor cells by human cytomegalovirus: evidence for inhibition of hematopoiesis and viral replication. *Blood.* 1996 Aug 15;88(4):1277-83.
  117. Zhuravskaya T, Maciejewski JP, Netski DM, Bruening E, Mackintosh FR, St Jeor S. Spread of human cytomegalovirus (HCMV) after infection of human hematopoietic progenitor cells: model of HCMV latency. *Blood.* 1997 Sep 15;90(6):2482-91
  118. Larsson S, Soderberg-Naucler C, Moller E. Productive cytomegalovirus (CMV) infection exclusively in CD13-positive peripheral blood mononuclear cells from CMV-infected individuals: implications for prevention of CMV transmission. *Transplantation.* 1998 Feb 15;65(3):411-5.
  119. Drago F, Aragone MG, Lugani C, Rebora A. Cytomegalovirus infection in normal and immunocompromised humans. A review. *Dermatology.* 2000;200(3):189-95. Review.
  120. de Jong MD, Boucher CA, Danner SA, Gazzard B, Griffiths PD, Katlama C, Lange JM, Richman DD, Vella S. Summary of the international consensus symposium on management of HIV, CMV and hepatitis virus infections. *Antiviral Res.* 1998 Jan;37(1):1-16. Review.
  121. Fine PE, Adelstein AM, Snowman J, Clarkson JA, Evans SM. Long term effects of exposure to viral infections in utero. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1985 Feb 16;290(6467):509-11.
  122. Cohen JL, Corey GR. Cytomegalovirus infection in the normal host. *Medicine (Baltimore).* 1985 Mar;64(2):100-14.
  123. Katlama C, Dickinson GM. Update on opportunistic infections. *AIDS.* 1993;7 Suppl 1:S185-94. Review.
  124. Jacobson MA, Zegans M, Pavan PR, O'Donnell JJ, Sattler F, Rao N, Owens S, Pollard R. Cytomegalovirus retinitis after initiation of highly active antiretroviral therapy. *Lancet.* 1997 May 17;349(9063):1443-5.
  125. Boeckh M, Bowden R. Cytomegalovirus infection in marrow transplantation. *Cancer Treat Res.* 1995;76:97-136
  126. Villanueva J, Garrity ER. Case 5: recurrent cytomegalovirus infection in a lung transplant recipient. *J Heart Lung Transplant.* 2000 Nov;19(11):1122-4.
  127. Buckner FS, Pomeroy C. Cytomegalovirus disease of the gastrointestinal tract

- in patients without AIDS. *Clin Infect Dis*. 1993 Oct;17(4):644-56. Review.
128. Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med*. 1998 Jun 11;338(24):1741-51. Review.
  129. Stagno S, Pass RF, Dworsky ME, Alford CA Jr. Maternal cytomegalovirus infection and perinatal transmission. *Clin Obstet Gynecol*. 1982 Sep;25(3):563-76.
  130. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 1999 Nov;138(5 Pt 2):S419-20. Review.
  131. Horger M, Brodoefel H, Schimmel H, Vogel M. HRCT-Diagnostik der CMV-Pneumonie. *Fortschr Röntgenstr* 2005; 177: 485-488
  132. Drew WL. Nonpulmonary manifestations of cytomegalovirus infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev*. 1992 Apr;5(2):204-10.
  133. V C Emery. Investigation of CMV disease in immunocompromised patients. *J Clin Pathol* 2001; 54:84-88
  134. Ljungman P, Griffiths P, and Paya C. Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Recipients. *Clinical Infectious Diseases* 2002;34:1094-1097
  135. Coskuncan NM, Jabs DA, Dunn JP, Haller JA, Green WR, Vogelsang GB, Santos GW. The eye in bone marrow transplantation. VI. Retinal complications. *Arch Ophthalmol*. 1994 Mar;112(3):372-9
  136. Miyamoto T, Gondo H, Miyoshi Y, Shigematsu H, Minematsu T, Takenaka K, Tanimoto K, Horiuchi T, Asano Y, Inaba S, Minamishima Y, Niho Y. Early viral complications following CD34-selected autologous peripheral blood stem cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol*. 1998 Feb;100(2):348-50
  137. Okamoto T, Okada M, Mori A, Saheki K, Takatsuka H, Wada H, Tamura A, Fujimori Y, Takemoto Y, Kanamaru A, Kakishita E. Successful treatment of severe cytomegalovirus retinitis with foscarnet and intraocular injection of ganciclovir in a myelosuppressed unrelated bone marrow transplant patient. *Bone Marrow Transplant*. 1997 Nov;20(9):801-3
  138. Ganly PS, Arthur C, Goldman JM, Schulenburg WE. Foscarnet as treatment for cytomegalovirus retinitis following bone marrow transplantation. *Postgrad Med J*. 1988 May;64(751):389-91
  139. Boeckh M, Ljungman P. Cytomegalovirus infection after BMT. In: R. Boeden, P. Ljungman, C. Paya, eds. *Transplant infections*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998:215-27
  140. Boeckh M, Gooley TA, Myerson D, Cunningham T, Schoch G, Bowden RA. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study. *Blood*. 1996 Nov 15;88(10):4063-71
  141. Crippa F, Corey L, Chuang EL, Sale G, Boeckh M. Virological, clinical, and ophthalmologic features of cytomegalovirus retinitis after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*. 2001 Jan 15;32(2):214-9
  142. Danise A, Cinque P, Vergani S, Candino M, Racca S, De Bona A, Novati R, Castagna A, Lazzarin A. Use of polymerase chain reaction assays of aqueous humor in the differential diagnosis of retinitis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*. 1997 Jun;24(6):1100-6
  143. Knox CM, Chandler D, Short GA, Margolis TP. Polymerase chain reaction-based assays of vitreous samples for the diagnosis of viral retinitis. Use in diagnostic dilemmas. *Ophthalmology*. 1998 Jan;105(1):37-44; discussion 44-5
  144. Einsele H, Ehninger G, Steidle M, Fischer I, Bihler S, Gerneth F, Vallbracht A,

- Schmidt H, Waller HD, Muller CA. Lymphocytopenia as an unfavorable prognostic factor in patients with cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *Blood*. 1993 Sep 1;82(5):1672-8
145. Fries BC, Khaira D, Pepe MS, Torok-Storb B. Declining lymphocyte counts following cytomegalovirus (CMV) infection are associated with fatal CMV disease in bone marrow transplant patients. *Exp Hematol*. 1993 Sep;21(10):1387-92
146. Riddell SR, Rabin M, Geballe AP, Britt WJ, Greenberg PD. Class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of cells infected with human cytomegalovirus does not require endogenous viral gene expression. *J Immunol*. 1991 Apr 15;146(8):2795-804
147. Greenberg P, Goodrich J, Riddell S. Adoptive immunotherapy of human cytomegalovirus infection: potential role in protection from disease progression. *Transplant Proc*. 1991 Jun;23(3 Suppl 3):97-101
148. Streilein J. Regional immunology of the eye: ocular infection and immunology. St. Louis: CV Mosby, 1996:19-32
149. Jacobson MA, Zegans M, Pavan PR, O'Donnell JJ, Sattler F, Rao N, Owens S, Pollard R. Cytomegalovirus retinitis after initiation of highly active antiretroviral therapy. *Lancet*. 1997 May 17;349(9063):1443-5
150. Boeckh M, Riddell SR, Cunningham T et al. Increased incidence of late CMV disease in allogeneic marrow transplant recipients after ganciclovir prophylaxis is due to a lack of CMV specific T cell responses. *Blood* 1996; 88 (Suppl 1): 302a
151. Seo SK, Regan A, Cihlar T, Lin DC, Boulad F, George D, Prasad VK, Kiehn TE, Polsky B. Cytomegalovirus ventriculoencephalitis in a bone marrow transplant recipient receiving antiviral maintenance: clinical and molecular evidence of drug resistance. *Clin Infect Dis*. 2001 Nov 1;33(9):e105-8
152. Wolf DG, Lurain NS, Zuckerman T, Hoffman R, Satinger J, Honigman A, Saleh N, Robert ES, Rowe JM, Kra-Oz Z. Emergence of late cytomegalovirus central nervous system disease in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Blood*. 2003 Jan 15;101(2):463-5
153. Anders HJ, Goebel FD. Cytomegalovirus polyradiculopathy in patients with AIDS. *Clin Infect Dis*. 1998 Aug;27(2):345-52
154. Clifford DB, Arribas JR, Storch GA, Tourtellote W, Wippold FJ. Magnetic resonance brain imaging lacks sensitivity for AIDS associated cytomegalovirus encephalitis. *J Neurovirol*. 1996 Dec;2(6):397-403
155. Zeiser R, Grulich C, Bertz H, Pantazis G, Hufert FT, Bley TA, Finke J. Late cytomegalovirus polyradiculopathy following haploidentical CD34+-selected hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2004 Jan;33(2):243-5
156. Li CR, Greenberg PD, Gilbert MJ, Goodrich JM, Riddell SR. Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood*. 1994 Apr 1;83(7):1971-9
157. Boeckh M, Leisenring W, Riddell SR, Bowden RA, Huang ML, Myerson D, Stevens-Ayers T, Flowers ME, Cunningham T, Corey L. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood*. 2003 Jan 15;101(2):407-14
158. Jacobson MA, Zegans M, Pavan PR, O'Donnell JJ, Sattler F, Rao N, Owens S, Pollard R. Cytomegalovirus retinitis after initiation of highly active antiretroviral

- therapy. *Lancet*. 1997 May 17;349(9063):1443-5.
159. Przepiorka D, LeParc GF, Werch J, Lichtiger B. Prevention of transfusion-associated cytomegalovirus infection. Practice parameter. American Society of Clinical Pathologists. *Am J Clin Pathol*. 1996 Aug;106(2):163-9.
  160. Beatty PG, Clift RA, Mickelson EM, Nisperos BB, Flournoy N, Martin PJ, Sanders JE, Stewart P, Buckner CD, Storb R, et al. Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings. *N Engl J Med*. 1985 Sep 26;313(13):765-71
  161. McGlave P, Bartsch G, Anasetti C, Ash R, Beatty P, Gajewski J, Kernan NA. Unrelated donor marrow transplantation therapy for chronic myelogenous leukemia: initial experience of the National Marrow Donor Program. *Blood*. 1993 Jan 15;81(2):543-50
  162. Ramsay NK, Davies S. Bone marrow transplant for acute leukaemia. *Baillieres Clin Haematol*. 1991 Apr;4(2):483-510
  163. Petersdorf EW, Longton GM, Anasetti C, Martin PJ, Mickelson EM, Smith AG, Hansen JA. The significance of HLA-DRB1 matching on clinical outcome after HLA-A, B, DR identical unrelated donor marrow transplantation. *Blood*. 1995 Aug 15;86(4):1606-13
  164. Sasazuki T, Juji T, Morishima Y, Kinukawa N, Kashiwabara H, Inoko H, Yoshida T, Kimura A, Akaza T, Kamikawaji N, Kodera Y, Takaku F. Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor. Japan Marrow Donor Program. *N Engl J Med*. 1998 Oct 22;339(17):1177-85. Erratum in: *N Engl J Med* 1999 Feb 4;340(5):402
  165. Meyers JD, Flournoy N, Thomas R. Risk factors for cytomegalovirus infection after human bone marrow transplantation. *J Infect Dis*. 1986;153:478
  166. Zaia JA. Cytomegalovirus infection. In: Forman SJ, Blume KG, Thomas ES, eds. *Bone Marrow Transplantation*. Boston, MA: Blackwell Scientific Publications; 1994:376
  167. Verdonck LF, Dekker AW, Rozenberg-Arska M, Van den Hoek MR. A risk-adapted approach with a short course of ganciclovir to prevent cytomegalovirus (CMV) pneumonia in CMV-seropositive recipients of allogeneic bone marrow transplants. *Clin Infect Dis*. 1997;24:901
  168. Bacigalupo A, Tedone E, Soracco M, et al. CMV-antigenemia after allogeneic bone marrow transplantation: correlation of CMV antigen positive cell numbers with transplant related mortality. *Bone Marrow Transplant*. 1995;16:155
  169. Spencer A, Szydlo RM, Brookes PA, Kaminski E, Rule S, van Rhee F, Ward KN, Hale G, Waldmann H, Hows JM, et al. Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia with volunteer unrelated donors using ex vivo or in vivo T-cell depletion: major prognostic impact of HLA class I identity between donor and recipient. *Blood*. 1995 Nov 1;86(9):3590-7
  170. Sierra J, Storer B, Hansen JA, Bjerke JW, Martin PJ, Petersdorf EW, Appelbaum FR, Bryant E, Chauncey TR, Sale G, Sanders JE, Storb R, Sullivan KM, Anasetti C. Transplantation of marrow cells from unrelated donors for treatment of high-risk acute leukemia: the effect of leukemic burden, donor HLA-matching, and marrow cell dose. *Blood*. 1997 Jun 1;89(11):4226-35
  171. McGlave P, Bartsch G, Anasetti C, Ash R, Beatty P, Gajewski J, Kernan NA. Unrelated donor marrow transplantation therapy for chronic myelogenous leukemia: initial experience of the National Marrow Donor Program. *Blood*. 1993 Jan 15;81(2):543-50

172. Hansen JA, Gooley TA, Martin PJ, Appelbaum F, Chauncey TR, Clift RA, Petersdorf EW, Radich J, Sanders JE, Storb RF, Sullivan KM, Anasetti C. Bone marrow transplants from unrelated donors for patients with chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1998 Apr 2;338(14):962-8
173. Byrne JL, Stainer C, Cull G, Haynes AP, Bessell EM, Hale G, Waldmann H, Russell NH. The effect of the serotherapy regimen used and the marrow cell dose received on rejection, graft-versus-host disease and outcome following unrelated donor bone marrow transplantation for leukaemia. *Bone Marrow Transplant.* 2000 Feb;25(4):411-7
174. Chakrabarti S, Mackinnon S, Chopra R, Kottaridis PD, Peggs K, O'Gorman P, Chakraverty R, Marshall T, Osman H, Mahendra P, Craddock C, Waldmann H, Hale G, Fegan CD, Yong K, Goldstone AH, Linch DC, Milligan DW. High incidence of cytomegalovirus infection after nonmyeloablative stem cell transplantation: potential role of Campath-1H in delaying immune reconstitution. *Blood.* 2002 Jun 15;99(12):4357-63
175. Mohty M, Faucher C, Vey N, Stoppa AM, Viret F, Chabbert I, Chabannon C, Bouabdallah R, Ladaïque P, Collet L, Zandotti C, Maraninchi D, Blaise D. High rate of secondary viral and bacterial infections in patients undergoing allogeneic bone marrow mini-transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000 Aug;26(3):251-5
176. Bornhauser M, Thiede C, Platzbecker U, Jenke A, Helwig A, Plettig R, Freiberg-Richter J, Rollig C, Geissler G, Lutterbeck K, Oelschlagel U, Ehninger G. Dose-reduced conditioning and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors in 42 patients. *Clin Cancer Res.* 2001 Aug;7(8):2254-62
177. Schetelig J, Kroger N, Held TK, Thiede C, Krusch A, Zabelina T, Dubiel M, Rick O, Bornhauser M, Ehninger G, Zander AR, Siegert W. Allogeneic transplantation after reduced conditioning in high risk patients is complicated by a high incidence of acute and chronic graft-versus-host disease. *Haematologica.* 2002 Mar;87(3):299-305
178. Schetelig J, Oswald O, Steuer N, Radonic A, Thulke S, Held TK, Oertel J, Nitsche A, Siegert W. Cytomegalovirus infections in allogeneic stem cell recipients after reduced-intensity or myeloablative conditioning assessed by quantitative PCR and pp65-antigenemia. *Bone Marrow Transplant.* 2003 Oct;32(7):695-701
179. Anasetti C, Beatty PG, Storb R, Martin PJ, Mori M, Sanders JE, Thomas ED, Hansen JA. Effect of HLA incompatibility on graft-versus-host disease, relapse, and survival after marrow transplantation for patients with leukemia or lymphoma. *Hum Immunol.* 1990 Oct;29(2):79-91
180. Ramsay NK, Davies S. Bone marrow transplant for acute leukaemia. *Baillieres Clin Haematol.* 1991 Apr;4(2):483-510
181. Krivit W, Shapiro E, Hoogerbrugge PM, Moser HW. State of the art review. Bone marrow transplantation treatment for storage diseases. *Keystone.* January 23, 1992. *Bone Marrow Transplant.* 1992;10 Suppl 1:87-96
182. Nademanee A, Schmidt GM, Parker P, Dagens AC, Stein A, Snyder DS, O'Donnell M, Smith EP, Stepan DE, Molina A, et al. The outcome of matched unrelated donor bone marrow transplantation in patients with hematologic malignancies using molecular typing for donor selection and graft-versus-host disease prophylaxis regimen of cyclosporine, methotrexate, and prednisone. *Blood.* 1995 Aug 1;86(3):1228-34
183. Siegert W, Beyer J, Kingreen D, Blasczyk R, Baumann H, Schwella N,

- Schleicher J, Kirsch A, Huhn D. Treatment of relapse after allogeneic bone marrow transplantation with unmanipulated G-CSF-mobilized peripheral blood stem cell preparation. *Bone Marrow Transplant.* 1998 Sep;22(6):579-83
184. Starobinski M, Roosnek E, Hale G, Roux E, Helg C, Chapuis B. T cell depletion of allogeneic peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant.* 1998 Feb;21(4):429-30
185. Eiermann TH, Lambrecht P, Zander AR. Monitoring anti-thymocyte globulin (ATG) in bone marrow recipients. *Bone Marrow Transplant.* 1999 Apr;23(8):779-81
186. Einsele H, Hebart H: Cellular immunity to viral and fungal antigens after stem cell transplantation; *Curr Opin Hematol* 2002, 9:485-489 *Hematol* (2003) 82 (Suppl 2):175-185
187. Chakrabarti S, Miiligan DW, Brown J, Osman H, Vipond IB, Pamphilon DH and Marks DI: Influence of cytomegalovirus (CMV) seropositivity on CMV infection, lymphocyte recovery and non-CMV infections following T-cell-depleted allogeneic stem cell transplantation: a comparison between two T-cell depletion regimens. *Bone Marrow Transplant* 2004, 33:197-204
188. Broers AE, van Der Holt R, van Essen JW et al. 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* 2000;95:2240-2245
189. Craddock C, Szydlo RM, Dazzi F et al. Cytomegalovirus seropositivity adversely influences outcome after T-depleted unrelated donor transplant in patients with chronic myeloid leukaemia: the case for tailored graft-versus-host disease prophylaxis. *Br J Haematol* 2000; 112:228-236
190. Kroger N, Zabelina T, Kruger W et al. Patient cytomegalovirus seropositivity with or without reactivation is the most important prognostic factor for survival and treatment-related mortality in stem cell transplantation from unrelated donors using pretransplant in vivo T-cell depletion with anti-thymocyte globulin. *Br J Haematol* 2001; 113:1060-1071
191. Broers AEC, van der Holt R, van Essner JWJ, Gratama J-W, Henzen-Logmans S, Kuenen-Boumeester V, Löwenberg B, Cornelissen JJ: 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* 2000; 95(7):2240-2245
192. Benz C, Utermohlen O, Wulf A, et al.: Activated virus-specific T cells are early indicators of anti-CMV immune reactions in liver transplant patients. *Gastroenterology* 2002, 122:1201-15
193. Mori T, Mori S, Kanda Y, Yakushiji K, Mineishi S, Takaue Y, Gondo H, Harada M, Sakamaki H, Yajima T, Iwao Y, Hibi T, Okamoto S: Clinical significance of cytomegalovirus (CMV) antigenemia in the prediction and diagnosis of CMV gastrointestinal disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004, 33:431-434
194. Boland GJ, Vlieger AM, Ververs C, De Gast GC. Evidence for transfer of cellular and humoral immunity to cytomegalovirus from donor to recipient in allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Exp Immunol.* 1992 Jun;88(3):506-11
195. Qamruddin AO, Oppenheim BA, Guiver M, Mutton KJ, Chopra R: Screening for cytomegalovirus (CMV) infection in allogeneic bone marrow transplantation using a quantitative whole blood polymerase chain reaction (PCR) method: analysis of potential risk factors for CMV infection. *Bone Marrow Transplant*

- 2001; 27:301-306
196. Kroger N, Zabelina T, Kruger W, Renges H, Stute N, Schrum J, Kabisch H, Schafhausen P, Jaburg N, Loliger C, Schafer P, Hinke A, Zander AR. Patient cytomegalovirus seropositivity with or without reactivation is the most important prognostic factor for survival and treatment-related mortality in stem cell transplantation from unrelated donors using pretransplant in vivo T-cell depletion with anti-thymocyte globulin. *Br J Haematol.* 2001 Jun;113(4):1060-71
  197. Mori T, Mori S, Kanda Y, Yakushiji K, Mineishi S, Takaue Y, Gondo H, Harada M, Sakamaki H, Yajima T, Iwao Y, Hibi T, Okamoto S: Clinical significance of cytomegalovirus (CMV) antigenemia in the prediction and diagnosis of CMV gastrointestinal disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004, 33:431-434
  198. Boström L, Ringden O, Gratama JW, Jacobsen N, Zawwn F, Nilsson B, for the Leukaemia Working Party of the European Group for Bone Marrow Transplantation. The impact of pre-transplant herpes virus serology on acute and chronic graft-versus-host-disease. *Transplant Proc.* 1990;22:206
  199. Lönnqvist B, Ringden O, Wahren B, Gahrton G, Lundgren G. Cytomegalovirus infection associated with and preceding chronic graft-versus-host disease. *Transplantation.* 1984;38:465
  200. Jacobsen N, Anderson HK, Skinhoj P et al. Correlation between donor CMV immunity and chronic GVHD after allogeneic bone marrow transplantation. *Scand J Haematol.* 1986;36:499
  201. Gratama JW, Fibbe WE, Naipal AMIH et al. Cytomegalovirus immunity and T-lymphocytes in bone marrow donors and acute GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 1986;1:141
  202. Gratama JW, Zwaan FE, Stijnen T et al. Herpes virus immunity and acute graft-versus-host-disease. *Lancet* 1987;1:471
  203. Grundy JE, Shanley JE, Shearer GM. Augmentation of graft-versus-host reaction by cytomegalovirus infection resulting in interstitial pneumonitis. *Transplantation.* 1985;39:548
  204. Hendrikx MGS, Beuken E, Slobbe RL, Bruggeman CA. Detection and sequence analysis of the major immediate early and PP150 gene of latent human cytomegalovirus in spleen, liver and kidney tissues of trauma victims. *J Med Virol.* 1996;50:193
  205. Grefte A, Van der Giessen M, Van Son W, The TH. Circulating cytomegalo (CMV)-infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. *J Infect Dis.* 1993;167:270
  206. Spector SA, Hsia K, Crager M, Pilcher M, Cabral S, Stempien MJ. Cytomegalovirus (CMV) DNA load is an independent predictor of CMV disease and survival in advanced AIDS. *J Virol.* 1999;73:7027-7030. Patient cytomegalovirus seropositivity with or without reactivation is the most important prognostic factor for survival and treatment-related mortality in stem cell transplantation from unrelated donors using pretransplant in vivo T-cell depletion with anti-thymocyte globulin. *Br J Haematol.* 2001 Jun;113(4):1060-71. Infectious complications after allogeneic stem cell transplantation
  207. Nachbaur D, Larcher C, Kircher B, Eibl G, Nussbaumer W, Gunsilius E, Haun M, Grünewald K, Gastl G: Risk for cytomegalovirus infection following reduced intensity allogeneic stem cell transplantation. *Ann Hematol* (2003) 82:621-627
  208. Chakrabarti S, Mackinnon S, Chopra R, Kottardis PD, Peggs K, O`Gorman P, Chakraverty R, Marshall T, Osman H, Mahendra P, Craddock C, Waldmann H,

- Hale G, Fegan CD, Yong K, Goldstone AH, Linch DC, Milligan DW: High incidence of cytomegalovirus infection after nonmyeloablative stem cell transplantation: potential role of Campath-1H in delaying immune reconstitution. *Blood* 2002; 99:4357-4363
209. Junghans C, Boeckh M, Carter RA, Sandmaier BM, Maris MB, Maloney DG, Chauncey RA, McSweeney PA, Little MT, Corey L, Storb R: Incidence and outcome of cytomegalovirus infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic stem cell transplantation, a matched control study. *Blood* 2002; 99:1978-1985
210. Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, Varadi G, Kirschbaum M, Ackerstein A, Samuel S, Amar A, Brautbar C, Ben-Tal O, Eldor A, Or R. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood*. 1998 Feb 1;91(3):756-63
211. McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, Sandmaier BM, Molina AJ, Maloney DG, Chauncey TR, Gooley TA, Hegenbart U, Nash RA, Radich J, Wagner JL, Minor S, Appelbaum FR, Bensinger WI, Bryant E, Flowers ME, Georges GE, Grumet FC, Kiem HP, Torok-Storb B, Yu C, Blume KG, Storb RF. Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood*. 2001 Jun 1;97(11):3390-400
212. Junghanss C, Marr KA, Carter RA, Sandmaier BM, Maris MB, Maloney DG, Chauncey T, McSweeney PA, Storb R. Incidence and outcome of bacterial and fungal infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a matched control study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8(9):512-20
213. Faucher C, Mohty M, Chabannon C et al. Alloegenic transplantation with ATG base reduced intensity regimen and bone marrow (BM) graft is associated with rapid donor chimerism, low GVHD rate an drapid CD8+ T cells recovery. *Bone Marrow Transplant* 2003; 29 (Supl 2): 157 (abstract 616)
214. Martino R, Caballero MD, Canals C, San Miguel J, Sierra J, Rovira M, Solano C, Bargay J, Perez-Simon J, Leon A, Sarra J, Brunet S, de la Camara R; alloPBSCT and Infectious/noninfectious Complications Subcommittees of the Grupo Espanol de Transplante Hematopoyetico (GETH). Reduced-intensity conditioning reduces the risk of severe infections after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001 Aug;28(4):341-7
215. Bacigalupo A, Lamparelli T, Bruzzi P, Guidi S, Alessandrino PE, di Bartolomeo P, Oneto R, Bruno B, Barbanti M, Sacchi N, Van Lint MT, Bosi A. Antithymocyte globulin for graft-versus-host disease prophylaxis in transplants from unrelated donors: 2 randomized studies from Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO). *Blood*. 2001 Nov 15;98(10):2942-7
216. Toome BK, Bowers KE, Scott GA. Diagnosis of cutaneous cytomegalovirus infection: a review and report of a case. *J Am Acad Dermatol*. 1991 May;24(5 Pt 2):860-7.
217. Reina J, Riera M, Bestard X, Villalonga C, Gasco J. [Virologic analysis of 1,000 blood samples processed for cytomegalovirus isolation (viremia) and pp65 antigenemia in immunodepressed patients] *Med Clin (Barc)*. 1998 Mar 7;110(8):281-4.
218. Riddell SR, Greenberg PD. T cell therapy of human CMV and EBV infection in

- immunocompromised hosts. *Rev Med Virol.* 1997 Sep;7(3):181-192.
219. Boeckh M, Stevens-Ayers T, Bowden RA. Cytomegalovirus pp65 antigenemia after autologous marrow and peripheral blood stem cell transplantation. *J Infect Dis.* 1996 Nov;174(5):907-12.
  220. Grefte JM, van der Gun BT, Schmolke S, van der Giessen M, van Son WJ, Plachter B, Jahn G, The TH. Cytomegalovirus antigenemia assay: identification of the viral antigen as the lower matrix protein pp65. *J Infect Dis.* 1992 Sep;166(3):683-4.
  221. von Laer D, Meyer-Koenig U, Serr A, Finke J, Kanz L, Fauser AA, Neumann-Haefelin D, Brugger W, Hufert FT. Detection of cytomegalovirus DNA in CD34+ cells from blood and bone marrow. *Blood.* 1995 Dec 1;86(11):4086-90.
  222. Landry ML, Ferguson D. Comparison of quantitative cytomegalovirus antigenemia assay with culture methods and correlation with clinical disease. *J Clin Microbiol.* 1993 Nov;31(11):2851-6.
  223. Winston DJ, Ho WG, Bartoni K, Champlin RE. Intravenous immunoglobulin and CMV-seronegative blood products for prevention of CMV infection and disease in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 1993 Sep;12(3):283-8
  224. Bacigalupo A, Tedone E, Sanna MA, et al. CMV infections following allogeneic BMT: risk factors, early treatment and correlation with transplant related mortality. *Hematologica.* 1997;77:507
  225. Winston DJ, Ho WG, Bartoni K, et al. Ganciclovir prophylaxis of cytomegalovirus infection and disease in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Ann Intern Med.* 1993;118:179
  226. Goodrich JM, Bowden RA, Fisher L, Keller C, Schock G, Meyers JD. Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant. *Ann Intern Med.* 1993;118:173
  227. Prentice HG, Kho P. Clinical strategies for the management of cytomegalovirus infection and disease in allogeneic bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant.* 1997;19:135
  228. Schmidt GM, Horak DA, Niland JC, Duncan SR, Forman SJ, Zaia JA. A randomized controlled trial of prophylactic ganciclovir for cytomegalovirus pulmonary infection in recipients of allogeneic marrow transplants. *N Engl J Med.* 1991;324:1005
  229. Goodrich JM, Mori M, Gleaves CA, et al. Early treatment with Ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 1991;325:1601
  230. Boeckh M, Gooley TH, Myerson D, Cunningham T, Schoch G, Bowden RA. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with Ganciclovir versus Ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study. *Blood.* 1996;88:4063
  231. Einsele H, Ehninger H, Hebart H, et al. Polymerase chain reaction monitoring reduces the incidence of cytomegalovirus disease and the duration and side effects of antiviral therapy after bone marrow transplantation. *Blood.* 1995;86:2815
  232. Goodrich JM, Bowden RA, Fisher L, Keller C, Schoch G, Meyers JD. Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant. *Ann Intern Med.* 1993 Feb 1;118(3):173-8
  233. Einsele H, Ehninger G, Hebart H, Wittkowski KM, Schuler U, Jahn G, Mackes P, Herter M, Klingebiel T, Löffler J, et al. Polymerase chain reaction monitoring reduces the incidence of cytomegalovirus disease and the duration and side

- effects of antiviral therapy after bone marrow transplantation. *Blood*. 1995 Oct 1;86(7):2815-20
234. Boeckh M, Gooley TA, Myerson D, Cunningham T, Schoch G, Bowden RA. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study. *Blood*. 1996 Nov 15;88(10):4063-71
  235. Bacigalupo A, Tedone E, Isaza A, et al. CMV-antigenemia after allogeneic bone marrow transplantation: correlation of CMV-antigen positive cell numbers with transplant-related mortality. *Bone Marrow Transplant*. 1995;16:155-161
  236. Spector SA, Wong R, Hsia K, Pilcher M, Stempien MJ. Plasma cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts CMV disease and survival in AIDS patients. *J Clin Invest*. 1998;101:497502.
  237. Spector SA, Hsia K, Crager M, Pilcher M, Cabral S, Stempien MJ. Cytomegalovirus (CMV) DNA load is an independent predictor of CMV disease and survival in advanced AIDS. *J Virol*. 1999;73:7027-7030
  238. Nichols WG, Corey L, Gooley T, Davis C, Boeckh M. High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *J Infect Dis*. 2002;185:273-282
  239. Boeckh M, Leisenring W, Riddell SR, Bowden RA, Huang M-L, Myerson D, Stevens-Ayers T, Flowers MED, Cunningham T, Corey L: Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood* 2003; 101:407-415
  240. Einsele H, Ehninger G, Steidle M, et al. Lymphocytopenia as an unfavorable prognostic factor in patients with cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *Blood*. 1993;82:1672-1678
  241. Junghanss C, Boeckh M, Carter RA, et al. Incidence and outcome of cytomegalovirus infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic stem cell transplantation: a matched control study. *Blood*. 2002;99:1978-1985
  242. Peggs KS, Preiser W, Kottaridis PD, et al. Extended routine polymerase chain reaction surveillance and pre-emptive antiviral therapy for cytomegalovirus after allogeneic transplantation. *Br J Haematol*. 2000;111:782-790
  243. Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med*. 1995;333:1038-1044
  244. Peggs K, Verfuert S, Mackinnon S. Induction of cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses using dendritic cells pulsed with CMV antigen: a novel culture system free of live CMV virions. *Blood*. 2001;97:994-1000
  245. Löffler J, Hebart H, Sepe S, Schumcher U, Klingebiel T, Einsele H. Detection of PCR-amplified fungal DNA by using a PCR-ELISA system. *Med Mycol*. 1998 Oct;36(5):275-9.
  246. Löffler J, Hebart H, Schumacher U, Reitze H, Einsele H. Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *J Clin Microbiol*. 1997 Dec;35(12):3311-2.
  247. Einsele H, Steidle M, Vallbracht A, Saal JG, Ehninger G, Müller CA. Early occurrence of human cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation as demonstrated by the polymerase chain reaction technique.
  248. Löffler, J.H. (1994). Vergleich von PCR, Plasma-PCR und Antigentest zum Nachweis von Cytomegalovirusinfektionen nach Stammzelltransplantationen.

- Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Universität Tübingen
249. Jiwa NM, Van Gemert GW, Raap AK, Van de Rijke FM, Mulder A, Lens PF, Salimans MM, Zwaan FE, Van Dorp W, Van der Ploeg M. Rapid detection of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes of viremic transplant recipients by the polymerase chain reaction. *Transplantation*. 1989 Jul;48(1):72-6.
  250. Grundy JE, Ehrnst A, Einsele H, Emery VC, Hebart H, Prentice HG, Ljungman P. A three-center European external quality control study of PCR for detection of cytomegalovirus DNA in blood. *J Clin Microbiol*. 1996 May;34(5):1166-70.
  251. Ruger R, Bornkamm GW, Fleckenstein B. Human cytomegalovirus DNA sequences with homologies to the cellular genome. *J Gen Virol*. 1984 Aug;65 (Pt 8):1351-64.
  252. Zhao JH, Curtis D, Sham PC. Model-free analysis and permutation tests for allelic associations. *Hum Hered*. 2000 Mar-Apr;50(2):133-9.
  253. Becker T, Knapp M. A powerful strategy to account for multiple testing in the context of haplotype analysis. *Am J Hum Genet*. 2004 Oct;75(4):561-70.
  254. Hampe J, Schreiber S, Krawczak M. Entropy-based SNP selection for genetic association studies. *Hum Genet*. 2003 Dec;114(1):36-43.
  255. Cannings C, Edwards AW. Natural selection and the de Finetti diagram. *n Hum Genet*. 1968 May;31(4):421-8
  256. Sugino K, Homma S, Takaya H, Miyamoto A, Sakamoto S, Kawabata M, Kish K, Tsuboi E, Motoi N, Yoshimura K. [Fatal invasive pulmonary aspergillosis triggered by influenza B virus infection in an individual with idiopathic pulmonary fibrosis] *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*. 2006 Mar;44(3):207-14.
  257. Shankar EM, Kumarasamy N, Rajan R, Balakrishnan P, Solomon S, Devaleenol B, Rao UA. *Aspergillus fumigatus*, *Pneumocystis jiroveci*, *Klebsiella pneumoniae* & *Mycoplasma fermentans* co-infection in a HIV infected patient with respiratory conditions from Southern India. *Indian J Med Res*. 2006 Feb;123(2):181-4.
  258. Matsushima H, Takayanagi N, Ubukata M, Sugita Y, Kanazawa M, Kawabata Y. [Invasive pulmonary aspergillosis following influenza A infection] *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*. 2001 Sep;39(9):672-7.
  259. Funabiki Y, Ishii K, Kusaka S, Hakamata Y, Wakatsuki Y, Murakami M, Yokode M, Kume N, Horiuchi H, Kita T. [Aspergillosis following influenza A infection] *Nippon Ronen Igakkai Zasshi*. 1999 Apr;36(4):274-8.
  260. Ghosh S, Champlin R, Couch R, Englund J, Raad I, Malik S, Luna M, Whimbey E. Rhinovirus infections in myelosuppressed adult blood and marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 1999 Sep;29(3):528-32.
  261. Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P, Corey L. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood*. 2002;100: 4358-4366.
  262. Björnsdóttir US, Cypkar DM. Asthma: an inflammatory mediator soup. *Allergy* 1999, 54 (suppl49):55-61.
  263. Kauffman HF, Tomme JF, van der Werf TS, den Monchy JG, Koeter GK. Review of fungus-induced asthmatic actions. *Am J Respir Crit Care Med* 1995, 151:2109-2115.
  264. Kauffman HF, Beaumont F, Sluter HJ, De Vries H. Immunologic observations in sera of a patient with allergic bronchopulmonary aspergillosis by means of the enzyme -linked immunoabsorbent assay. *Allergy Clin Immunol* 1984, 74:741-746.
  265. Taramelli D, Malabarba MG, Sala G, Basilico N, Coccuza G. Production of

- cytokines by alveolar and peritoneal macrophages stimulated by *Aspergillus fumigatus* conidia or hyphae. *J Med Vet Mycol* 1996, 34:49-56.
266. Filler SG, Pfunder AS, Spellberg BJ, Spellberg JP, Edwards JE Jr. *Candida albicans* stimulates cytokine production and leucocyte adhesion molecule expression by endothelial cells. *Infect Immun* 1996, 64:2609-2617.
  267. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA: International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2000, 52:145-176
  268. Kim CH, Broxmeyer HE: Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J Leukoc Biol* 1999, 65:6-15
  269. Baggiolini M: Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998, 392:565-568
  270. Luster A: Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998, 228:436-445
  271. Zlotnik A, Morales J, Hedrick JA: Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit Rev Immunol* 1999, 19:1-47
  272. Farber JM: Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol* 1997, 61:246-25
  273. Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B: Chemokine receptor specific for IP-10 and Mig: structure, function and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med* 1996, 184:963-969
  274. Semenzato G: Chemotactic cytokines: from the molecular level to clinical use. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1998, 15:131-133
  275. Larrubia JR, Calvino M, Benito S, Sanz-de-Villalobos E, Perna C, Perez-Hornedo J, Gonzalez-Mateos F, Garcia-Garzon S, Bienvenido A, Parra T. The role of CCR5/CXCR3 expressing CD8+ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2007 May 24
  276. Hebart H, Bollinger C, Fisch P, et al. Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies. *Blood.* 2002;100:4521-4528.
  277. Mlynarczewska A, Wysoczanska B, Karabon L, Bogunia-Kubik K, Lange A. Lack of IFN-gamma 2/2 homozygous genotype independently of recipient age and intensity of conditioning regimen influences the risk of aGVHD manifestation after HLA-matches sibling haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2004, 34:339-344
  278. Lopez-Maderuelo D, Arnalich F, Serantes R, Gonzalez A, Codoceo R, Madero R, Vazquez JJ, Montiel C. Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Apr 1;167(7):970-5.
  279. Chong WP, Ip WK, Tso GH, Ng MW, Wong WH, Law HK, Yung RW, Chow EY, Au KL, Chan EY, Lim W, Peiris JS, Lau YL. The interferon gamma gene polymorphism +874 A/T is associated with severe acute respiratory syndrome. *BMC Infect Dis.* 2006 May 4;6:82.
  280. Dorman SE, Holland SM. Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000 Dec;11(4):321-33.
  281. Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:581-620. Epub 2001 Oct 4. Review.
  282. Oshima K, Cui G, Tung T, Okotie O, Laks H, Sen L. Exogenous IL-10 overexpression reduces perforin production by activated allogenic CD8+ cells

- and prolongs cardiac allograft survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Jan;292(1):H277-84. Epub 2006 Sep 1.
283. Takabayashi M, Kanamori H, Takasaki H, Yamaji S, Koharazawa H, Taguchi J, Tomita N, Fujimaki K, Fujisawa S, Maruta A, Ishigatsubo Y. A possible association between the presence of interleukin-4-secreting cells and a reduction in the risk of acute graft-versus-host disease. *Exp Hematol*. 2005 Feb;33(2):251-7.
284. Hubbard VM, Eng JM, Ramirez-Montagut T, Tjoe KH, Muriglan SJ, Kochman AA, Terwey TH, Willis LM, Schiro R, Heller G, Murphy GF, Liu C, Alpdogan O, van den Brink MR. Absence of inducible costimulator on alloreactive T cells reduces graft versus host disease and induces Th2 deviation. *Blood*. 2005 Nov 1;106(9):3285-92.
285. Uboldi de Capei M, Dametto E, Fasano ME, Messina M, Pratico' L, Rendine S, Segoloni G, Curtioni ES. Cytokines and chronic rejection: a study in kidney transplant long-term survivors. *Transplantation*. 2004 Feb 27;77(4):548-52.
286. Chatila TA. Interleukin-4 receptor signaling pathways in asthma pathogenesis. *Trends Mol Med*. 2004 Oct;10(10):493-9. Review.
287. Hytonen AM, Lowhagen O, Arvidsson M, Balder B, Bjork AL, Lindgren S, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Padyukov L. Haplotypes of the interleukin-4 receptor alpha chain gene associate with susceptibility to and severity of atopic asthma. *Clin Exp Allergy*. 2004 Oct;34(10):1570-5.
288. Gervaziev YV, Kaznacheev VA, Gervazieva VB. Allelic polymorphisms in the interleukin-4 promoter regions and their association with bronchial asthma among the Russian population. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;141(3):257-64.
289. Wenzel SE, Balzar S, Ampleford E, Hawkins GA, Busse WW, Calhoun WJ, Castro M, Chung KF, Erzurum S, Gaston B, Israel E, Teague WG, Curran-Everett D, Meyers DA, Bleecker ER. IL-4R{alpha} Mutations are Associated with Asthma Exacerbations and Mast Cells/IgE Expression. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Dec 14
290. Knutsen AP, Kariuki B, Consolino JD, Warriar MR. IL-4 alpha chain receptor (IL-4Ralpha) polymorphisms in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Clin Mol Allergy*. 2006 Feb 17;4:3.
291. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989;170:2081-2095
292. Powrie F, Menon S, Coffman RL. Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. *Eur J Immunol*. 1993 Nov;23(11):3043-9.
293. Leeuwenberg JF, Jeunhomme TM, Buurman WA. Slow release of soluble TNF receptors by monocytes in vitro. *J Immunol*. 1994 Apr 15;152(8):4036-43.
294. Willems F, Marchant A, Delville JP, Gerard C, Delvaux A, Velu T, de Boer M, Goldman M. Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur J Immunol*. 1994 Apr;24(4):1007-9.
295. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683-765.
296. Matsuda M, Salazar F, Petersson M, Masucci G, Hansson J, Pisa P, Zhang QJ, Masucci MG, Kiessling R. Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *J Exp Med* 180:2371, 1994
297. de Waal Malefyt R, Yssel H, Roncarolo MG, Spits H, de Vries JE. Interleukin-10. *Curr Opin Immunol*. 1992 Jun;4(3):314-20. Review.

298. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4+CD25+ regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 2002;196:389-399.
299. Lalani I, Bhol K, Ahmed AR. Interleukin-10:biology, role in inflammation and autoimmunity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 79:469, 1997.
300. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Viera P, Mossman TR. 1993. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 11:165-190
301. Kim DH, Lee NY, Sohn SK, Baek JH, Kim JG, Suh JS, Lee KB, Shin IH. IL-10 promoter gene polymorphism associated with the occurrence of chronic GVHD and its clinical course during systemic immunosuppressive treatment for chronic GVHD after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Transplantation*. 2005 Jun 15;79(11):1615-22.
302. Asseman C, Powrie F. Interleukin 10 is a growth factor for a population of regulatory T cells. *Gut* 42:157, 1998
303. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A DR4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389 :737, 1997
304. Lin MT, Storer B, Martin PJ, Tseng LH, Gooley T, Chen PJ, Hansen JA. Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2003 Dec 4;349(23):2201-10.
305. 5119: Cavet J, Middleton PG, Segall M, Noreen H, Davies SM, Dickinson AM. Recipient tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms associate with early mortality and acute graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplants. *Blood* 1999;94:3941-3946.
306. Cullup H, Dickinson AM, Jackson GH, Taylor PR, Cavet J, Middleton PG. Donor interleukin 1 receptor antagonist genotype associated with acute graft-versus-host disease in human leucocyte antigen-matched sibling allogeneic transplants. *Br J Haematol* 2001;113:807-813.
307. Takahashi H, Furukawa T, Hashimoto S, et al. Contribution of TNF-alpha and IL-10 gene polymorphisms to graft-versus-host disease following allo-hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000;26:1317-1323.
308. Socie G, Loiseau P, Tamouza R, et al. Both genetic and clinical factors predict the development of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation* 2001;72:699-706.
309. Cavet J, Dickinson AM, Norden J, Taylor PR, Jackson GH, Middleton PG. Interferon-gamma and interleukin-6 gene polymorphisms associate with graft-versus-host disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Blood* 2001;98:1594-1600.
310. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991;147:3815-3822.
311. Ding L, Linsley PS, Huang LY, Germain RN, Shevach EM. IL10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol* 1993;151:1224-1234.
312. Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med* 1996;184:19-29.
313. Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, Squadrone S, de Waal Malefyt R, Roncarolo MG. IFN- $\alpha$  and IL10 induce the differentiation of human type 1 T

- regulatory cells. *J Immunol* 2001;166:5530-5539.
314. Zeller JC, Panoskaltis-Mortari A, Murphy WJ, et al. Induction of CD4+ T cell alloantigen-specific hyporesponsiveness by IL10 and TGF-beta. *J Immunol* 1999;163:3684-3691.
  315. Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4+CD25+ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002;99:3493-3499.
  316. Fiorentin DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 147:3815, 1991
  317. Eissner G, Kohlhuber F, Grell M, Ueffing M, Scheurich P, Hieke A, Multhoff G, Bornkamm GW, Holler E. Critical involvement of transmembrane tumor necrosis factor-alpha in endothelial programmed cell death mediated by ionizing radiation and bacterial endotoxin. *Blood* 86:4184, 1995
  318. Bunnapradist S, Jordan SC. The role of cytokines and cytokine gene polymorphism in T-cell activation and allograft rejection. *Ann Acad Med Singapore*. 2000 May;29(3):412-6.
  319. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, Oksenberg J, McNicholl J, Pociot F, Hardt C, D'Alfonso S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun*. 1999 Sep;1(1):3-19.
  320. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott P, Hutchinson IV. 1997. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 24:1-8
  321. Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, Keijsers V, Westendorp RGJ, Huizinga TWJ. Interleukin 10 secretion in relation tum human IL-10 locus haplotypes. *Pro Natl Acad Sci USA* 95:9465, 1998
  322. Eskdale J, Wordsworth P, Bowman S, Field M, Gallagher G. Association between polymorphisms at the human IL-10 locus and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*. 1997 Jun;49(6):635-9.
  323. Mehrian R, Quismorio FP Jr, Strassmann G, Stimmler MM, Horwitz DA, Kitridou RC, Gauderman WJ, Morrison J, Brautbar C, Jacob CO. Synergistic effect between IL-10 and bcl-2 genotypes in determining susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1998 Apr;41(4):596-602.
  324. Eskdale J, McNicholl J, Wordsworth P, Jonas B, Huizinga T, Field M, Gallagher G. Interleukin-10 microsatellite polymorphisms and IL-10 locus alleles in rheumatoid arthritis susceptibility. *Lancet*. 1998 Oct 17;352(9136):1282-3.
  325. Huizinga TW, Keijsers V, Yanni G, Hall M, Ramage W, Lanchbury J, Pitzalis C, Drossaers-Bakker WK, Westendorp RG, Breedveld FC, Panayi G, Verweij CL. Are differences in interleukin 10 production associated with joint damage? *Rheumatology (Oxford)*. 2000 Nov;39(11):1180-8.
  326. D'Alfonso S, Rampi M, Bocchio D, Colombo G, Scorza-Smeraldi R, Momigliano-Richardi P. Systemic lupus erythematosus candidate genes in the Italian population: evidence for a significant association with interleukin-10. *Arthritis Rheum*. 2000 Jan;43(1):120-8.
  327. Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo P. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1999 Jun;42(6):1101-8.
  328. Lazarus M, Hajeer AH, Turner D, Sinnott P, Worthington J, Ollier WE, Hutchinson IV. Genetic variation in the interleukin 10 gene promoter and

- systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1997 Dec;24(12):2314-7.
329. Coakley G, Mok CC, Hajeer AH, Ollier WE, Turner D, Sinnott PJ, Hutchinson IV, Panayi GS, Lanchbury JS. Interleukin-10 promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis and Felty's syndrome. *Br J Rheumatol.* 1998 Sep;37(9):988-91
  330. Gibson AW, Edberg JC, Wu J, Westendorp RG, Huizinga TW, Kimberly RP. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL10 promoter affect IL10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2001;166:3915-3922.
  331. Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo P. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:1101-1108.
  332. Keijsers V, Verweij CL, Westendorp RGJ, Breedveld FC, Huizinga TWJ. IL10 polymorphisms in relation to production and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997;40:Suppl:S179-S179.
  333. Koss K, Satsangi J, Fanning GC, Welsh KI, Jewell DP. Cytokine (TNF $\alpha$ , LT $\alpha$  and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes Immun* 2000;1:185-190.
  334. Seo KW, Kim DH, Sohn SK, Lee NY, Chang HH, Kim SW, Jeon SB, Baek JH, Kim JG, Suh JS, Lee KB. Protective role of interleukin -10 promoter polymorphism in the pathogenesis of invasive pulmonary aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2005;36:1089-1095.
  335. Brouard J, Knauer N, Boelle PY, Corvol H, Henrion-Caude A, Flamant C, Bremont F, Delaisi B, Duhamel JF, Marguet C, Roussey M, Miesch MC, Chadelat K, Boule M, Fauroux B, Ratjen F, Grasmann H, Clement A. Influence of interleukin-10 on *Aspergillus fumigatus* infection in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 2005 Jun 1;191(11):1988-91
  336. Azarpira N, Aghdaie MH, Geramizadeh B, Behzadi S, Nikeghbalian S, Sagheb F, Rahsaz M, Behzad-Behbahanie A, Ayatollahi M, Darai M, Azarpira MR, Banihashemie M, Tabei SZ. Cytokine gene polymorphisms in renal transplant recipients. *Exp Clin Transplant.* 2006 Dec;4(2):528-31.
  337. Ahlenstiel G, Iwan A, Nattermann J, Bueren K, Rockstroh JK, Brackmann HH, Kupfer B, Landt O, Peled A, Sauerbruch T, Spengler U, Woitas RP. Distribution and effects of polymorphic RANTES gene alleles in HIV/HCV coinfection -- a prospective cross-sectional study. *World J Gastroenterol.* 2005 Dec 28;11(48):7631-8.
  338. Goulding C, McManus R, Murphy A, MacDonald G, Barrett S, Crowe J, Hegarty J, McKiernan S, Kelleher D. The CCR5-delta32 mutation: impact on disease outcome in individuals with hepatitis C infection from a single source. *Gut.* 2005 Aug;54(8):1157-61. Epub 2005 Apr 29. Erratum in: *Gut.* 2005 Oct;54(10):1508. McManus, R
  339. Konishi I, Horiike N, Hiasa Y, Michitaka K, Onji M. CCR5 promoter polymorphism influences the interferon response of patients with chronic hepatitis C in Japan. *Intervirolgy.* 2004;47(2):114-20.
  340. Mascheretti S, Hinrichsen H, Ross S, Buggisch P, Hampe J, Foelsch UR, Schreiber S. Genetic variants in the CCR gene cluster and spontaneous viral elimination in hepatitis C-infected patients. *Clin Exp Immunol.* 2004 May;136(2):328-33.

341. Hellier S, Frodsham AJ, Hennig BJ, Klenerman P, Knapp S, Ramaley P, Satsangi J, Wright M, Zhang L, Thomas HC, Thursz M, Hill AV. Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection. *Hepatology*. 2003 Dec;38(6):1468-76.
342. Wasik TJ, Smolen J, Kruszynski P, Bratosiewicz-Wasik J, Beniowski M. Effects of CCR5-delta32, CCR2-64I and SDF-1-3'A polymorphic alleles on human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) *Wiad Lek*. 2005;58(9-10):500-7.
343. Chang HY, Ahn SH, Kim DY, Shin JS, Kim YS, Hong SP, Chung HJ, Kim SO, Yoo WD, Han KH. [Association between CCR5 promoter polymorphisms and hepatitis B virus infection] *Korean J Hepatol*. 2005 Jun;11(2):116-24.
345. O'Brien SJ, Moore JP. The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunol Rev*. 2000 Oct;177:99-111.
346. Bogunia-Kubik K, Duda D, Suchnicki K, Lange A. CCR5 deletion mutation and its association with the risk of developing acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2006 Dec;91(12):1628-34.
347. Yigit B, Bozkurt N, Berber I, Titiz I, Isbir T. Analysis of CC chemokine receptor 5 and 2 polymorphisms and renal transplant survival. *Cell Biochem Funct*. 2006 Apr 6
348. Ueda A, Ishigatsubo Y, Okubo T, Yoshimura T. Transcriptional regulation of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. Cooperation of two NF-kappaB sites and NF-kappaB/Rel subunit specificity. *J Biol Chem*. 1997 Dec 5;272(49):31092-9.
349. Park BL, Kim YJ, Cheong HS, Kim LH, Choi YH, Lee HS, Shin HD. Association of common promoter polymorphisms of MCP1 with hepatitis B virus clearance. *Exp Mol Med*. 2006 Dec 31;38(6):694-702.
350. Lacha J, Hribova P, Kotsch K, Brabcova I, Bartosova K, Volk HD, Vitko S. Effect of cytokines and chemokines (TGF-beta, TNF-alpha, IL-6, IL-10, MCP-1, RANTES) gene polymorphisms in kidney recipients on posttransplantation outcome: influence of donor-recipient match. *Transplant Proc*. 2005 Mar;37(2):764-6.
351. 5075: Ruster M, Sperschneider H, Funfstuck R, Stein G, Grone HJ. Differential expression of beta-chemokines MCP-1 and RANTES and their receptors CCR1, CCR2, CCR5 in acute rejection and chronic allograft nephropathy of human renal allografts. *Clin Nephrol*. 2004 Jan;61(1):30-9.
352. Kruger B, Schroppel B, Ashkan R, Marder B, Zulke C, Murphy B, Kramer BK, Fischereder M. A Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) polymorphism and outcome after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Oct;13(10):2585-9.
353. McDermott DH, Yang Q, Kathiresan S, Cupples LA, Massaro JM, Keaney JF Jr, Larson MG, Vasan RS, Hirschhorn JN, O'Donnell CJ, Murphy PM, Benjamin EJ. CCL2 polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattractant protein-1 levels and myocardial infarction in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2005 Aug 23;112(8):1113-20.
354. Hsu DH, de Waal Malefyt R, Fiorentino DF, Dang MN, Vieira P, de Vries J, Spits H, Mosmann TR, Moore KW. Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science*. 1990 Nov 9;250(4982):830-2
355. Hurme M, Haanpaa M, Nurmikko T, Wang XY, Virta M, Pessi T, Kilpinen S,

- Hulkkonen J, Helminen M. IL-10 gene polymorphism and herpesvirus infections. *J Med Virol.* 2003;70 Suppl 1:S48-50.
356. Helminen M, Lahdenpohja N, Hurme M. Polymorphism of the interleukin-10 gene is associated with susceptibility to Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis.* 1999 Aug;180(2):496-9.
357. Haanpää M, Nurmikko T, Hurme M. 2001. Polymorphisms of the IL-10 gene is associated with susceptibility to Herpes zoster. *Scand J Infect Dis* 34:112-114.
358. Helminen ME, Kilpinen S, Virta M, Hurme M. Susceptibility to primary Epstein Barr virus infection is associated with IL-10 gene promoter polymorphism. *J Infect Dis* 2001;184:777-80
359. Lowe PR, Galley HF, Abdel-Fattah A, Webster NR. Influence of interleukin-10 polymorphisms on interleukin-10 expression and survival in critically ill patients. *Crit Care Med.* 2003 Jan;31(1):34-8.
360. Suthanthiran M. The importance of genetic polymorphisms in renal transplantation. *Curr Opin Urol.* 2000 Mar;10(2):71-5.
361. Akalin E, Murphy B. Gene polymorphisms and transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2001 Oct;13(5):572-6
362. Asderakis A, Sankaran D, Dyer P, Johnson RW, Pravica V, Sinnott PJ, Roberts I, Hutchinson IV. Association of polymorphisms in the human interferon-gamma and interleukin-10 gene with acute and chronic kidney transplant outcome: the cytokine effect on transplantation. *Transplantation.* 2001 Mar 15;71(5):674-7.
363. McShane P. Association of polymorphisms in the human interferon-gamma and interleukin-10 gene with acute and chronic kidney transplant outcome. *Transplantation.* 2002 May 27;73(10):1682.
364. Hahn AB, Kasten-Jolly JC, Constantino DM, Graffunder E, Singh TP, Shen GK, Conti DJ. TNF-alpha, IL-6, IFN-gamma, and IL-10 gene expression polymorphisms and the IL-4 receptor alpha-chain variant Q576R: effects on renal allograft outcome. *Transplantation.* 2001 Aug 27;72(4):660-5.
365. Oshima K, Cui G, Tung T, Okotie O, Laks H, Sen L. Exogenous IL-10 overexpression reduces perforin production by activated allogenic CD8+ cells and prolongs cardiac allograft survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Jan;292(1):H277-84. Epub 2006 Sep 1.
366. Gourley IS, Denofrio D, Rand W, Desai S, Loh E, Kamoun M. The effect of recipient cytokine gene polymorphism on cardiac transplantation outcome. *Hum Immunol.* 2004 Mar;65(3):248-54.
367. Koksoy S, Kakoulidis TP, Shirwan H. Chronic heart allograft rejection in rats demonstrates a dynamic interplay between IFN-gamma and IL-10 producing T cells. *Transpl Immunol.* 2004 Nov;13(3):201-9.
368. Krenger W, Hill GR, Ferrara JL. Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease. *Transplantation.* 1997 Aug 27;64(4):553-8.
369. Keen LJ, DeFor TE, Bidwell JL, Davies SM, Bradley BA, Hovs JM. Interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha region haplotypes predict transplant-related mortality after unrelated donor stem cell transplantation. *Blood.* 2004 May 1;103(9):3599-602.
370. Cavet J, Middleton PG, Segall M, Noreen H, Davies SM, Dickinson AM. Recipient Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interleukin-10 Gene Polymorphisms associate with early mortality and acute mortality and acute graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplants. *Blood,* Vol94, No 11 (December 1), 1999: pp 3941-3946
371. Holler E, Roncarolo MG, Hintermeier-Knabe R, et al. Prognostic significance of

- increased IL10 production in patients prior to allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:237-241.
372. Bacchetta R, Bigler M, Touraine JL, et al. High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 1994;179:493-502.
373. Holler E, Roncarolo MG, Hintermeier-Knabe R, Ertl B. Low incidence of transplant related complications in patients with high spontaneous IL-10 production prior to conditioning – evidence for a protective role of IL-10 in allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant* 15:59, 1995
374. Korholz D, Kunst D, Hempel L, Sohngen D, Heyll A, Bonig H, Gobel U, Zintl F, Burdach S. Decreased Interleukin 10 and increased interferon-gamma production in patients with chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 19:691, 1997
375. Korholz D, Hempel D, Packeisen J, Kunst D, Zintl F, Burdach S. Significance of interleukin 10 for acute graft versus host disease in children and adolescents after allogeneic bone marrow transplantation. *Klin Padiatr* 208:141, 1996
376. Miura Y, Thoburn CJ, Bright EC, Chen W, Nakao S, Hess AD. Cytokine and chemokine profiles in autologous graft-versus-host disease (GVHD): interleukin 10 and interferon gamma may be critical mediators for the development of autologous GVHD. *Blood*. 2002 Oct 1;100(7):2650-8.
377. Takahashi H, Furukawa T, Hashimoto S, Suzuki N, Kuroha T, Yamazaki F, Inano K, Takahashi M, Aizawa Y, Koike T. Contribution of TNF-alpha and IL-10 gene polymorphisms to graft-versus-host disease following allo-hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2000 Dec;26(12):1317-23.
378. Kim DH, Lee NY, Sohn SK, Baek JH, Kim JG, Suh JS, Lee KB, Shin IH. IL-10 promoter gene polymorphism associated with the occurrence of chronic GVHD and its clinical course during systemic immunosuppressive treatment for chronic GVHD after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Transplantation*. 2005 Jun 15;79(11):1615-22.
379. Bertinetto FE, Dall'Omo AM, Mazzola GA, Rendine S, Berrino M, Bertola L, Magistrini P, Caropreso P, Falda M, Locatelli F, Busca A, Amoroso A. Role of non-HLA genetic polymorphisms in graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Immunogenet*. 2006 Oct;33(5):375-84.
380. Laguila Visentainer JE, Lieber SR, Lopes Persoli LB, Dutra Marques SB, Vigorito AC, Penteado Aranha FJ, de Brito Eid KA, Oliveira GB, Martins Miranda EC, Bragotto L, de Souza CA. Relationship between cytokine gene polymorphisms and graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation in a Brazilian population. *Cytokine*. 2005 Nov 3;32(3-4):171-7.
381. Karabon L, Wysoczanska B, Bogunia-Kubik K, Suchnicki K, Lange A. IL-6 and IL-10 promoter gene polymorphisms of patients and donors of allogeneic sibling hematopoietic stem cell transplants associate with the risk of acute graft-versus-host disease. *Hum Immunol*. 2005 Jun;66(6):700-10.
382. Wu JM, Bensen-Kennedy D, Miura Y, Thoburn CJ, Armstrong D, Vogelsang GB, Hess AD. The effects of interleukin 10 and interferon gamma cytokine gene polymorphisms on survival after autologous bone marrow transplantation for patients with breast cancer. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005 Jun;11(6):455-64.
383. Lin MT, Storer B, Martin PJ, Tseng LH, Gooley T, Chen PJ, Hansen JA.

- Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2003 Dec 4;349(23):2201-10.
384. Mullighan C, Heatley S, Doherty K, Szabo F, Grigg A, Hughes T, Schwarzer A, Szer J, Tait B, To B, Bardy P. Non-HLA immunogenetic polymorphisms and the risk of complications after allogeneic hemopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation.* 2004 Feb 27;77(4):587-96.
  385. Eskdale J, Wordworth P, Bowman S, Field M, Gallagher G. Associations between polymorphisms at the human IL-10 locus and systemic lupus erthematosus. *Tissue Antigens* 49:635, 1997
  386. Konenkov VI, Smol'nikova MV. Polymorphism of promotor sites of interleukins-4 and -10 and tumor necrosis factor-alpha genes in HIV-infected patients. *Bull Exp Biol Med.* 2002 Apr;133(4):389-91.
  387. Keen LJ, DeFor TE, Bidwell JL, Davies SM, Bradley BA, Hows JM. Interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha region haplotypes predict transplant-related mortality after unrelated donor stem cell transplantation. *Blood.* 2004 May 1;103(9):3599-602.
  388. Roilides E, Dimitriadou-Georgiadou A, Sein T et al. Tumor necrosis factor alpha enhances antifungal activities of polymorphonuclear and mononuclear phagocytes against *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1998;66:5999-6003
  389. Wu MS, Huang SP, Chang YT, Shun CT, Chang MC, Lin MT, Wang HP, Lin JT. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter polymorphisms in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *J Infect Dis.* 2002 Jan 1;185(1):106-9.
  390. Döcke WD, Prösch S, Fietze E, Kimel V, Zuckermann H, Klug C, et al. Cytomegalovirus reactivation and tumor necrosis factor. *Lancet* 1994;343:2639
  391. Kriesel JD, Ricigliano J, Spruaence SL, Garza HH, Hill JM, Neuronal reactivation of herpes simplex virus may involve interleukin-6. *J Neurovirol* 1997;3:441-8
  392. Kim DH, Lee NY, Sohn SK, Baek JH, Kim JG, Suh JS, Lee KB, Shin IH. IL-10 promoter gene polymorphism associated with the occurrence of chronic GVHD and its clinical course during systemic immunosuppressive treatment for chronic GVHD after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Transplantation.* 2005 Jun 15;79(11):1615-22.
  393. Spencer JV, Lockridge KM, Barry PA, Lin G, Tsang M, Penfold ME, Schall TJ. Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10. *J Virol.* 2002 Feb;76(3):1285-92.
  394. Bertinetto FE, Dall'Omo AM, Mazzola GA, Rendine S, Berrino M, Bertola L, Magistroni P, Caropreso P, Falda M, Locatelli F, Busca A, Amoroso A. Role of non-HLA genetic polymorphisms in graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Immunogenet.* 2006 Oct;33(5):375-84.
  395. Varani S, Frascaroli G, Homman-Loudiyi M, Feld S, Landini MP, Soderberg-Naucleer C. Human cytomegalovirus inhibits the migration of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR1 and CCR5. *J Leukoc Biol.* 2005 Feb;77(2):219-28.

---

## 2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

*SNP*: Single Nukleotid Polymorphismen  
*HCMV*: Humanes Cytomegalovirus  
*DNA*: Deoxyribonucleic Acid  
*HLA*: Human Leukocyte Antigen  
*UTR*: Untranslated Region  
*mRNA*: messenger Ribonucleic Acid  
*NCBI*: National Center for Biotechnology Information  
*AS*: Aminosäure  
*A*: Adenin  
*T*: Thymin  
*G*: Guanin  
*C*: Cytosin  
*rs*: reference SNP accession ID  
*ZVK*: Zentraler Venenkatheter  
*GvHD*: Graft-versus-Host-Disease  
*ARDS*: Acute Respiratory Distress Syndrome  
*RSV*: Respiratory Syncytial Virus  
*G-CSF*: Granulocyte-Colony Stimulating Factor  
*HHV*: Humanes Herpesvirus  
*VZV*: Varizella-Zoster-Virus  
*EBV*: Epstein-Barr-Virus  
*T*: Thymus  
*B*: Bone marrow  
*HSCT*: Hematopoietic Stem Cell Transplantation  
*IA*: Invasive Aspergillose  
*spp*: Spezies  
*HIV*: Humanes Immundefizienz-Virus  
*KMT*: Knochenmarktransplantation  
*ABPA*: Allergische Bronchopulmonale Aspergillose  
*AIDS*: Acquired Immune Deficiency Syndrome  
*TNF*: Tumor-Nekrose-Faktor  
*MIP*: Macrophage Inflammatory Protein  
*IL*: Interleukin  
*IFN*: Interferon  
*Th*: T-Helferzellen  
*IFI*: Invasive Fungal Infection  
*PBSCT*: Peripheral Blood Stem Cell Transplantation  
*BMT*: Bone Marrow Transplantation  
*GETH*: AlloPBSCT And Infectious/Non-infectious Complications Subcommittees Of  
The Grupo Español De Trasplante Hematopoyético  
*MRT*: Magnetresonanztomographie  
*CT*: Computertomographie  
*PCR*: Polymerase Chain Reaction  
*BAL*: Bronchoalveoläre Lavage  
*IFICG*: Invasive Fungal Infections Cooperative Group  
*EORTC*: European Organisation for Research on Treatment of Cancer  
*MSG*: US Mycoses Study Group  
*IPA*: Invasive Pulmonale Aspergillose

---

SCT: Stem Cell Transplantation  
NCCLS: *National Committee of Clinical Laboratory Standards*  
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
GM: Galactomannan  
rRNA: ribosomale RNA  
PAS: Periodic Acid *Schiff* reaction  
IE: Immediate Early  
E: Early  
L: Late  
MHC: Major Histocompatibility Complex  
CD: Cluster of Differentiation  
HAART: Highly Active Antiretroviral Therapy  
PCP: Pneumocystis-Carinii-Infektion  
GGO: Ground-Glass Opacity  
BOOP: Bronchiolitis Obliterans Organizing Pneumonia  
ADV: Adenovirus  
PRP: Polyradikulopathie  
PT-LPD: Posttransplantation Lymphoproliferative Disorders  
ATG: Anti-Thymozyten-Globulin  
TCD: T-Zell-Depletion  
IgG: Immunglobulin G  
TRM: Translation Related Mortality  
CTL: Cytotoxic T Lymphocytes  
pp65: a 65-KDa phosphoprotein  
VOD: Veno-Occlusive Disease  
CsA: Cyclosporin A  
MMF: Mycophenolat Mofetil  
ATG: Antithymocyten Globulin  
MTX: Methotrexat  
TBI: Total Body Irradiation  
NAT: Nukleinsäure-Amplifikationstechniken  
IgM: Immunglobulin M  
FITC: Fluorescein-Isothiocyanat  
FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting  
NASBA: Nucleic-Acid-Sequence-Based-Amplification  
EDTA: Ethylene-Diamine-Tetraacetic Acid  
HCT: Hybrid-Capture-Test  
IP: Interstitielle Pneumonie  
GCV: Ganciclovir  
MCP: Monocyte Chemoattractant Protein  
SZT: Stammzelltransplantation  
CLL: Chronisch lymphatische Leukämie  
NHL: Non-Hodgkin-Lymphom  
MDS: Myelodysplastisches Syndrom  
ALL: Akute Lymphatische Leukämie  
CML: Chronische Myeloische Leukämie  
AML: Akute Myeloische Leukämie  
SAA: Schwere Aplastische Anämie  
MM: Multiples Myelom  
OMF: Osteomyelofibrose  
T-PLL: Prolymphozytische T-Zell-Leukämie

---

*PNH*: Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria  
*DSM*: German Collection of Microorganisms  
*NaCl*: Natriumchlorid  
*CFU*: Colony Forming Unit  
*RCLB*: Red Cell Lysis Buffer  
*WCLB*: White Cell Lysis Buffer  
*Tris*: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan  
*H<sub>2</sub>O*: Wasser  
*Taq*: *Thermus aquaticus*  
*SDS*: Natriumdodecylsulfat  
*TAE*: Tris-Acetat-EDTA-Puffer  
*ABTS*: 2,2'-Azino-Bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)  
*SLT*: Solid Logic Technology  
*NaOH*: Natriumhydroxid  
*SSPE*: Natriumchlorid-Natriumdihydrogen-Phosphat-EDTA  
*bp*: Basenpaar  
*dNTP*: Desoxytrinukleotidphosphate  
*dATP*: 2'-Deoxyadenosin 5'-Triphosphat  
*dCTP*: 2'-Deoxycytidine 5'-Triphosphat  
*dGTP*: 2'-Deoxyguanosine 5'-Triphosphat  
*dTTP*: 2'-Deoxythymidine 5'-Triphosphat  
*MgCl<sub>2</sub>*: Magnesiumchlorid  
*BSA*: Bovines Serum Albumin  
*UV*: Ultraviolett  
*PVP 40*: Polyvinylpyrrolidon  
*CoCl<sub>2</sub>*: Phosgen  
*HCL*: Chlorwasserstoff  
*AP*: Alkalische Phosphatase  
*BCIP*: 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat  
*NBT*: Nitroblau-Tetrazoliumchlorid  
*ATP*: Adenosintriphosphat  
*APS*: Adenosin-5'-Phosphosulfat  
*PP<sub>i</sub>*: Pyrophosphat  
*CCD*: Charge-Coupled Device  
*ATP*: Adenosintriphosphat  
*dATP $\alpha$ S*: Desoxyadenosinalphathiotriphosphat  
*RT*: Real Time  
*c-DNA*: copy DNA  
*FAM*: 6-Carboxy-Fluoreszin  
*FET*: Fluoreszenzenergietransfer  
*ROX*: Referenzfarbstoff  
*LD*: Linkage Disequilibrium  
*EH*: Estimated Haplotype Frequency  
*HWE*: Hardy-Weinberg Equilibrium  
*OR*: Odds Ratio  
*CCR*: Chemokine (C-C motif) Receptor  
*CCL*: Chemokine (C-C motif) Ligand  
*CXCL*: Chemokine (C-X-C motif) Ligand  
*SCYA*: Small inducible Cytokine member  
*TLR*: Toll-Like Receptor  
*Ralpha*: receptor alpha

*TGF*: Transforming Growth Factor

*Tr*: T-regulatory

*RANTES*: Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted

*PMNs*: Polymorphkernige neutrophile Granulozyten

*iDCs*: interdigitierende dendritische Zellen

*SARS*: Severe Acute Respiratory Syndrome

*CSIF*: Zytokinsyntheseinhibitorfaktor

*NK*: Natürliche Killerzellen

*FcγR-Expression*: Fragment, crystallizable Receptor gamma I

*ADCC*: Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity

*ICAM*: intercellular adhesion molecule

*IL-1-RA*: IL-1-Rezeptorantagonisten

*Tr*: T-regulatory

*NF-κB*: nuclear factor-kappa B

*BCRF*: B-cell replacement factor

*PBMC*: Peripheral Blood Mononuclear Cell

## 2 TABELLENVERZEICHNIS

Tab.1:	Allgemeine Kriterien der SNP-Selektion
Tab.2:	Übersicht über die ausgewählten SNPs
Tab.3:	Übersicht Risikogruppen Aspergillose
Tab.4:	Faktoren, die zu einem schlechten Therapieansprechen führen
Tab.5:	Diagnostisches Vorgehen: Überblick
Tab.6a:	Patientenkriterien
Tab.6b:	Mikrobiologische Kriterien
Tab.6c:	Klinische Kriterien
Tab.7:	Prozentuale Darstellung des CMV-Erkrankungsrisikos in Abhängigkeit vom serologischen Status von Organempfänger und –spender
Tab.8:	Diagnostische Algorithmen bei Verdacht auf eine CMV-Krankheit
Tab.9:	Untersuchte klinische Parameter Aspergillose
Tab.10:	Untersuchte klinische Parameter CMV
Tab.11a:	Zusammensetzung des “Red Cell Lysis Buffer” (RCLB)
Tab.11b:	Zusammensetzung des “White Cell Lysis Buffer“ (WCLB)
Tab.11c:	Zusammensetzung des Lytikase-Puffers
Tab.12a:	10-fach PCR-Puffer
Tab.12b:	Zusammensetzung des PCR-Mastermix
Tab.12c:	Temperaturprofil
Tab.13a:	Zusammensetzung des 5 x Laufpuffers
Tab.13b:	Zusammensetzung des 1 x TAE-Puffers
Tab.14a:	HCMV-Primersequenzen
Tab.14b:	DR $\beta$ -Primersequenz
Tab.14c:	PCR-Mix/Probe
Tab.14d:	10 x PCR-Puffer
Tab.15:	PCR-Protokoll
Tab.16:	Zusammensetzung der Prähybridisierungslösung
Tab.17:	Sonden
Tab.18:	Markierungsansatz
Tab.19a:	Waschlösung 1
Tab.19b:	Waschlösung 2
Tab.20:	Puffer 1
Tab.21a:	Antikörperlösung
Tab.21b:	Puffer 3
Tab.22a:	Farblösung
Tab.22b:	Puffer 4
Tab.23:	Slot-Blot-Signale der Eichkurve
Tab.24:	Cochran-Armitage-Trend-Test
Tab.25a-c:	Allelic Odds Ratio
Tab.26:	Fisher’s exakter Test
Tab.27:	Assoziation zwischen definierten klinischen Risikofaktoren und Aspergillose-Erkrankung
Tab.28:	Assoziation zwischen definierten klinischen Risikofaktoren und HCMV-Reaktivierung und –Erkrankung
Tab.29:	Assoziation zwischen genetischen Polymorphismen in den Genen IFN- $\gamma$ und IL-10 und einer Aspergillose –Erkrankung
Tab.30:	Assoziation zwischen genetischen Polymorphismen in den Genen CCR5, MCP1 und IL-10 und einer HCMV-Reaktivierung und – Erkrankung

---

#### 4 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb.1:** Das menschliche Genom  
*Quelle: <http://www.koshland-sciencemuseum.org/exhibitdna/images/dna/intro02.gif>*
- Abb.2:** Lokalisation von SNPs in menschlicher DNA  
*Quelle: <http://www.giantyardsale.com/pictures/corn%20imp%20small.jpg>*
- Abb.3:** Aspergillus fumigatus  
*Quelle: <http://science.compulenta.ru/upload/iblock/ba5/aspergillus.JPG>*
- Abb.4:** Radiologiebefund einer Aspergillose  
*Quelle: [http://www.mevis.de/~hhj/Lunge/ima/inf\\_asp\\_rau.JPG](http://www.mevis.de/~hhj/Lunge/ima/inf_asp_rau.JPG)*
- Abb.5:** CMV-Virion  
*Quelle: <http://www.biosciences.bham.ac.uk/labs/sweet/images/hsv-3b.jpg>*
- Abb.6:** Radiologischer Befund einer CMV-Pneumonie  
*Quelle: <http://www.mayoclinicproceedings.com/images/7804/7804cr-fig2.jpg>*
- Abb.7:** Krankheitsverteilung Aspergillose
- Abb.8:** Prozentuale Verteilung gesicherte/mögliche/keine Aspergillose
- Abb.9:** Krankheitsverteilung CMV
- Abb.10:** CMV-Serostatus
- Abb.11a:** CMV-Reaktivierungen
- Abb.11b:** CMV-Reaktivierungen und -Erkrankungen
- Abb.11c:** CMV-Reaktivierungen erkrankt vs. nicht erkrankt
- Abb.12a-d:** SNP-Genotypisierung mittels Pyrosequenzierung
- Abb.13:** SNP-Genotypisierung mittels Realtime-quantitativer-PCR (Taqman-Assay<sup>TM</sup>)
- Abb.14:** De-Finetti-Diagramm

## **5 DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank aussprechen an all diejenigen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

In erster Linie danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Hermann Einsele für die Überlassung des Themas.

Des Weiteren bedanke ich mich ganz besonders bei Herrn Privatdozent Dr. Jürgen Löffler für die außerordentlich sympathische Betreuung meiner Arbeit.

Großer Dank gilt Herrn Dr. Michael Steffens für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei der statistischen Auswertung.

Frau Renate Schwedes, Herrn Garbis Sahak und Herrn Dr. Rudolf Trenschele danke ich für die Bereitstellung der klinischen Daten der Patienten.

Schließlich gebührt der größte Dank meinen Eltern dafür, dass sie mir das Studium der Medizin überhaupt erst ermöglicht haben. Mit immerwährendem Vertrauen und Glauben an mich haben Sie mich zu dem werden lassen, was ich heute bin.

*Diese Studie wurde unterstützt von Forschungsförderungsmitteln des "National Genomic Research Network", dem EU-Projekt "The Development of Immunotherapeutic Strategies to Treat Haematological and Neoplastic Diseases on the Basis of Optimised Allogeneic Stem Cell Transplantation" (Allostem; LSHB-CT-2004-503319) and the EuroNet Leukemia (LSHC-CT-2004-503216).*

---

**6 LEBENS LAUF**


---

09/1986 – 06/1990	Grundschule Kürnbach <i>Schülerin</i>
09/1990 – 06/1999	Melanchthon-Gymnasium Bretten <i>Schülerin</i>
Seit 04/2001	Eberhard-Karls-Universität Tübingen <i>Studentin der Humanmedizin</i>
09/1999 - 11/1999	Rechbergklinik Bretten, Lehrkrankenhaus Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg <i>Praktikantin im Krankenpflegedienst</i>
04/2000 - 08/2000	DRK Bretten/ProMedic, Karlsruhe <i>Auszubildende im Rettungsdienst</i>
03/2004 - 04/2004	Rechbergklinik Bretten, Lehrkrankenhaus Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Bretten <i>Famulantin in der Anästhesie bei Chefarzt Dr. Heinz Kaiser</i>
09/2004 - 10/2004	St. Mary's Hospital, Lehrkrankenhaus der University of Southampton, Newport , Isle of Wight, England <i>Famulantin in der Inneren Medizin bei Consultant Dr. Eluzai Hakim</i>
02/2005 – 04/2005	St. John's Hospital, Lehrkrankenhaus der University of Edinburgh, Livingston, Schottland <i>Famulantin in der Plastischen Chirurgie bei Registrar Dr. Will Anderson</i>
08/2005 – 09/2005	Praxis Dr. Martina Pitsch, Bonndorf <i>Famulantin in der Allgemeinmedizin</i>
02/2006 – 05/2006	Spital Schwyz, Lehrkrankenhaus der Universität Zürich, Schwyz, Schweiz <i>Unterassistentin (1. Terial des Praktischen Jahres) in der Chirurgie bei Dr. Jürg Pfister (Allgemein- und Gefässchirurgie), Dr. Roger Schlüchter (Allgemein- und Abdominalchirurgie), Dr. Pierre Lichtenhahn (Allgemeinchirurgie und Traumatologie) und Dr. René Orlor (Orthopädie). Außerdem Assistentin in der Gynäkologie bei Chefarzt Dr. Urs Baumann und Co-Chefarzt Dr. Karl Rohner</i>
06/2006 – 09/2006	Universitätsklinikum Tübingen <i>Studentin im Praktischen Jahr (2. Terial) in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie bei Prof. Dr. Dr. Siegmair Reinert, Präsident der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie</i>
10/2006 – 01/2007	Somerset Hospital, Lehrkrankenhaus der University of Cape Town, Kapstadt, Südafrika <i>Studentin im Praktischen Jahr (3. Terial) in der</i>

*Inneren Medizin bei Consultant Prof. Roal van Zyl-  
Smit, Head of the Department*

*08.11.2007*

*Ärztliche Prüfung*

---