

Aus der Abteilung der Nephrologie und internistischen Intensivmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*Einfluss von Zytokingenpolymorphismen auf die Entstehung  
von EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen post  
transplantationem*

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Natalia Schneider, Zahnärztin

aus Inowroclaw/ Polen

Gutachter/in:     1. Herr Prof. Dr. W. Birchmeier  
                          2. Frau Priv.-Doz. Dr. med. A. Korfel  
                          3. Herr Prof. Dr. med. A. Pezzutto

Datum der Promotion: 23.06.2013

Meinen lieben Eltern

# Inhaltsverzeichnis

---

Abbildungsverzeichnis.....	iii
Tabellensverzeichnis.....	iv
Abkürzungsverzeichnis.....	v
1. Publikation.....	1
2. Einleitung.....	2
2.1 Transplantation .....	2
2.1.1 Komplikationen nach Transplantation .....	2
2.2 PTLD (post-transplant lymphoproliferative disorder) .....	3
2.2.1 Zeitpunkt der Entstehung und Lokalisation der PTLD .....	4
2.2.2 EBV- assoziierte PTLD.....	4
2.3 Epstein-Barr-Virus (EBV) .....	5
2.3.1 Charakterisierung von EBV .....	5
2.3.2 Vermehrungszyklus.....	6
2.3.3 Infektion mit EBV.....	8
2.3.4 Besonderheiten bei einer Immunsuppression .....	9
2.3.5 Diagnostiken von EBV .....	9
2.4 Zytokine/ Zytokingenpolymorphismen .....	10
2.4.1 Zytokine.....	10
2.4.2 Interleukin(IL)-10 .....	11
2.4.3 TGF-beta .....	12
2.4.4 IFN-gamma .....	13
2.4.5 TNF-alpha .....	13
2.4.6 Polymorphismus .....	14
2.5 Fragestellung .....	18
3. Material und Methoden .....	19
3.1 Material.....	19
3.1.1 Chemikalien.....	19
3.1.2 Geräte .....	20
3.1.3 Patienten.....	20
3.2 Methoden .....	21
3.2.1 DNA-Isolation .....	21
3.2.2 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	21
3.2.3 Nachweis der Cytokin-SNP .....	21
3.2.3.1 Allgemeines Prinzip einer PCR.....	21
3.2.3.2 Prinzip einer spezifischen Zytokin-SNP-PCR.....	22

3.2.3.3	One-Lambda Zytokin-SNP-PCR .....	25
3.2.4	Agarosegelelektrophorese .....	26
3.2.5	Statistische Analysen .....	27
4.	Ergebnisse.....	29
4.1	Selektion der Studienteilnehmer/Studienpopulation .....	29
4.2	Auswertung der Ergebnisse anhand einzelner Beispiele .....	33
4.2.1	Ergebnisse zu den einzelnen SNPs .....	41
5.	Diskussion.....	43
6.	Zusammenfassung .....	50
8.	Literaturverzeichnis .....	52
9.	Anhang .....	62
9.1	Lebenslauf .....	62
9.2.	Eidesstattliche Erklärung .....	63
9.3	Danksagung .....	64

## Abbildungsverzeichnis

---

<b>Abbildung 1. Überblick einer EBV-Infektion.....</b>	<b>7</b>
<b>Abbildung 2. Schematische Darstellung der untersuchenden Zytokin-SNPs.....</b>	<b>15</b>
<b>Abbildung 3. Darstellung eines schematischen Bandenmusters für die Gelauswertung.....</b>	<b>27</b>
<b>Abbildung 4. Ergebnis einer -308 TNF-alpha One-Lambda-SNP-PCR.....</b>	<b>34</b>
<b>Abbildung 5. Ergebnis einer +915 TGF-beta1 Codon 25 One-Lambda-SNP-PCR.....</b>	<b>35</b>
<b>Abbildung 6. Ergebnis einer +869 TGF-beta1 Codon 10 One-Lambda-SNP-PCR.....</b>	<b>37</b>
<b>Abbildung 7. Ergebnis einer -1082 Interleukin-10 One-Lambda-SNP-PCR. ....</b>	<b>38</b>
<b>Abbildung 8. Ergebnis einer +874 Interferon-gamma One-Lambda-SNP-PCR. ....</b>	<b>40</b>

## Tabellenverzeichnis

---

<b>Tabelle 1. Unterfamilie der Herpesviridae.....</b>	<b>5</b>
<b>Tabelle 2. Chemikalien und Kits. ....</b>	<b>19</b>
<b>Tabelle 3. Geräte. ....</b>	<b>20</b>
<b>Tabelle 4. Zytokinpolymorphismen mit den unterschiedlichen Genotypen. ....</b>	<b>23</b>
<b>Tabelle 5. Zytokin-Genotypisierungsplatte. ....</b>	<b>24</b>
<b>Tabelle 6. Zytokin-SNP-PCR Ansätze. ....</b>	<b>25</b>
<b>Tabelle 7. Allgemeines Zytokin-SNP-PCR-Programm (Zwei-Schritt-PCR). ....</b>	<b>26</b>
<b>Tabelle 8. Demographische Charakteristika in Fall- und Kontrollgruppe. ....</b>	<b>31</b>
<b>Tabelle 9. Klinische Daten, Diagnosen, Einteilung, Grunderkrankungen und Therapien der PTLD-Patienten. . ....</b>	<b>32</b>
<b>Tabelle 10. Zytokin-Polymorphismen mit den entsprechenden Phänotypen. ....</b>	<b>33</b>
<b>Tabelle 11. Häufigkeiten von Genotypen in einer Kohorte transplantierte Patienten. ....</b>	<b>42</b>

## Abkürzungsverzeichnis

---

ARMS	„Amplification Refractory Mutation System“
B-Zellen	B-Lymphozyten verantwortlich für die humorale Abwehr: Antikörperbildung, Antigen-Antikörperreaktionen und das humorale Gedächtnis
BKV; ICV	Polyomaviren
bp	Basenpaar
CMV	Zytomegalievirus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EBER	EBV-codierte RNA-Moleküle
EBNA-1	EBV -codiertes nukleäres Antigen 1
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„enzyme-linked Immunosorbent assay“
g	Gramm
h	Stunde
HHV	humane Herpesviren
HSV1	Herpes-simplex-Virus 1
HSV2	Herpes-simplex-Virus 2
IFN-gamma	Interferon-gamma
IL-10	Interleukin-10
IM	Infektiose Mononukleose
kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
L	Liter
m	Milli
MANOVA	multivariante Varianzanalyse
min	Minute
μ	Mikro
n	Nano
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NK	Naturell Killer Cells

OD	Optische Dichte
OKT3	monoklonaler Antikörper gegen das CD3-Oberflächenantigen auf T-Lymphozyten
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Primer	Oligodesoxyribonukleotide
PTLD	Posttransplantationslymphom („post-transplantat lymphoproliferative disorder“)
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus/„ <i>single nucleotide polymorphism</i> “
TGF-beta1	transforming Growth Factor-beta1
Th1/Th2	T-Helferzellen
TLR	Toll Like Receptor
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
VCA	IgG,IgM (Antikörper gegen das EBV)
VZV	Varicella-Zoster-Virus

## **1. Publikation**

Nina Babel, Athanasios Vergopoulos, Ralf Ulrich Trappe, Stefan Oertel, Markus H. Hammer, Stoyan Karaivanov, Natalia Schneider, Hanno Riess, Matthias Papp-Vary, Ruth Neuhaus, Lukasz Pawel Gondek, Hans-Dieter Volk, and Petra Reinke.

Evidence for Genetic Susceptibility Towards Development of Posttransplant Lymphoproliferative Disorder in Solid Organ Recipients

Transplantation Volume 84, Number 3, August 15, 2007

## **2. Einleitung**

### **2.1 Transplantation**

Seit der ersten erfolgreichen Nierentransplantation in Boston im Jahre 1954 nimmt die Zahl der jährlich transplantierten Organe stetig zu. Insgesamt wurden seit 1963 bis Ende 2005, 54.116 Nierentransplantationen deutschlandweit durchgeführt (Kirchner et al., 2007). Die Nierentransplantation ist die am häufigsten durchgeführte Organtransplantation, jedoch gewinnt auch die Transplantation von Leber oder Herz immer mehr an Bedeutung. Laut der Deutschen Stiftung für Organtransplantation (DSO) warten trotz des Anstiegs an erfolgreichen Operationen weiterhin mehrere Tausend Patienten auf lebenswichtige Organe. Misserfolge von Transplantationen sind hauptsächlich durch Funktionsverluste aufgrund akuter und chronischer Abstoßungsreaktionen bedingt. Erste klinische Erfolge in der Prophylaxe und Therapie von Abstoßungsreaktionen wurden ab 1966 in Denver und ab 1968 in München beschrieben (Kirchner et al., 2007).

Obwohl die Behandlungsstrategien zur Organtransplantation in den letzten Jahren stetig weiterentwickelt wurden, können sich im Rahmen der Therapie schwerwiegenden Komplikationen ergeben, die zum Verlust des Organs führen können. Hieran sind Abstoßungsprozesse durch das körpereigene Immunsystem beteiligt, die sich therapeutisch nur schwer beeinflussen lassen. Voraussetzung für die Erhaltung des transplantierten Spenderorgans ist in der Regel eine lebenslange Immunsuppression, die ihrerseits erhebliche Nebenwirkungen aufweist und auch zu einer Verminderung der Lebensqualität der Patienten führt.

#### **2.1.1 Komplikationen nach Transplantation**

Neben den chirurgischen Komplikationen wie Wundinfektionen, Blutungen, Thrombosen des Transplantates oder Ureter-Obstruktion treten immunologische Komplikationen wie Transplantatabstoßung und Infektionen auf (Kirchner et al., 2007; Schlich, 1998).

Unter einer Transplantatabstoßung versteht man eine Immunreaktion des Körpers auf ein körperfremdes Transplantat. Sie tritt dann auf, wenn das Abwehrsystem das transplantierte Organ als fremd erkennt und bekämpft. Um eine Transplantatabstoßung durch das körpereigene Abwehrsystem zu verhindern,

müssen die Patienten Immunsuppressiva einnehmen. Diese Präparate unterdrücken das Immunsystem, d.h. die körpereigene Abwehr gegen fremde Zellen wird abgeschwächt und gleichzeitig steigt dadurch die Infektionsgefahr. Somit können Immunsuppressiva zu chronischen Virusinfektionen führen, die wiederum zur Ursache von Tumoren werden können (Vajdic et al., 2006). Infektionen nach einer Nierentransplantation sind mit einer hohen Morbidität und Mortalität assoziiert. Potenzielle Infektionsherde im Nierentransplantatempfänger sollen vor dem Eingriff identifiziert werden um rechtzeitig therapiert werden zu können.

## **2.2 PTLD (post-transplant lymphoproliferative disorder)**

Das Posttransplantationslymphom (post transplant lymphoproliferative disorder = PTLD) ist eine relativ seltene, dafür aber häufig verheerend verlaufende Komplikation bei Transplantationen solider Organe mit hoher Mortalität und hoher Abstoßungsrate des Allotransplantats (Hanto, 1995). Es handelt sich um aggressive Proliferation von B-Lymphozyten, die in der Mehrzahl der Fälle durch eine Infektion des Epstein-Barr Virus (EBV) ausgelöst wird (Dockrell et al., 1998; Quinlan et al., 2011). Die Entstehung eines Lymphoms nach Transplantation wurde von Doak et al. im Jahre 1968 nach einer Nierentransplantation beschrieben (Doak et al., 1968). Die Inzidenz eine PTLD zu entwickeln, variiert je nach transplantiertem Organ und der Wahl und Intensität der Immunsuppression (Swinnen, 2000). Bei Patienten mit Leber- oder Nierentransplantation liegt sie bei 1-6% (Cao et al., 1998; Dharnidharka et al., 2001), während Herz- und Lungentransplantationen eine erhöhte Inzidenz von 3-20% aufweisen (Cohen et al., 2000).

Nach histologischer Klassifikation ist PTLD eine heterogene Gruppe von monoklonalen bis reaktiv polyklonalen lymphoproliferativen Läsionen (Nalesnik et al., 1988). In Europa und den USA entstammen ca. 85% der PTLD aus B-Zell Linien. Daneben werden T- oder Natürliche (NK)-Lymphome bei organtransplantierten Patienten ebenfalls zu den PTLD gezählt.

Die Rolle von neueren Immunsuppressiva bei der Entstehung von PTLD ist bereits vielfach in Studien untersucht worden (Caillard et al., 2005; Opelz and Dohler, 2004; Shapiro et al., 1999; Vegso et al., 2011). Von besonderem Interesse sind hierbei die verschiedenen anti-T Lymphozyten-Antikörper, insbesondere jedoch die monoklonalen OKT3 Antikörper, sowie Tacrolimus (Cockfield et al., 1993; Shapiro et

al., 1999). Trotz vergleichbarer Gaben an Immunsuppressiva entwickelte jedoch nur eine kleine Patientengruppe PTLD. Der Nachweis der Prädispositionsfaktoren für die Entwicklung der PTLD ist für das Verständnis und Management dieser Patienten von entscheidender Bedeutung.

### **2.2.1 Zeitpunkt der Entstehung und Lokalisation der PTLD**

Eine der wichtigsten Eigenschaften der PTLD ist der Zeitpunkt des Auftretens nach der Transplantation. Durch die erhöhte Immunsuppression direkt nach der Transplantation als Prophylaxe einer Abstoßungsreaktion ist das Risiko eine PTLD zu entwickeln im ersten Jahr signifikant erhöht (Kroes et al., 1997). Das Verhalten und die Charakteristika der früh auftretenden PTLD (< 1 Jahr post transplantationem) und der spät auftretenden PTLD (> 1 Jahr post transplantationem) sind oftmals sehr unterschiedlich (Swinnen, 2000). Hierbei sind unterschiedliche Risikofaktoren sowie Entstehungsmechanismen zu vermuten.

Das Gewebe der Manifestation einer PTLD scheint mit dem Zeitpunkt der Entstehung assoziiert zu sein. Direkt nach der Transplantation tritt die PTLD meist in dem transplantierten Organ auf. In mehreren Studien konnten im ersten Jahr nach einer Lungentransplantation in über 50% der Patienten eine PTLD im Transplantat nachgewiesen werden, wohin gegen in einem späteren Zeitraum das kaum mehr der Fall war (Bakker et al., 2005; Ghobrial et al., 2005; Quinlan, et al., 2011). Der pathophysiologische Mechanismus, der zu dieser bevorzugten Lokalisation im Transplantat führt, ist jedoch noch unklar.

### **2.2.2 EBV- assoziierte PTLD**

Neben der Immunsuppression gilt eine EBV Infektion als Hauptrisikofaktor für die PTLD Entwicklung (Vegso et al., 2011). Aufgrund seiner Präsenz in den meisten lymphoproliferativen Läsionen wurde EBV ursächlich mit PTLD assoziiert (Baumforth et al., 1999; Kawa, 2000). 80% der Tumore bei immunsupprimierten Patienten zeigten Hinweise auf eine Reaktivierung des lytischen (early Antigen) Zyklus, weiterhin enthielten 30-40% der Tumore EBV late-Antigene oder Replikations-DNA (Montone et al., 1996; Rea et al., 1994). Fast alle Lymphoproliferativen Läsionen, die in der frühen Phase nach Transplantation entstehen, sind EBV positiv.

Bei EBV-seronegativen Transplantatempfängern wie pädiatrischen Patienten, die ein Organ eines EBV-seropositiven Spenders (EBV Mismatch) erhalten, besteht ein erhöhtes Risiko eine PTLD zu entwickeln. Die Inzidenz einer PTLD liegt bei diesen Patienten zwischen 23 bis 50 % im Vergleich mit 0,7 - 1,9 % bei seropositiven Empfängern (Armitage et al., 1991; Shahinian et al., 2003; Shapiro et al., 1999; Swinnen, 2000; Walker et al., 1995).

## 2.3 Epstein-Barr-Virus (EBV)

### 2.3.1 Charakterisierung von EBV

Das Epstein-Barr Virus (EBV) wurde im Jahr 1964 zum ersten Mal von Epstein, Achong und Barr in Zellkulturen des Burkitt-Lymphomes, einem in Zentralafrika und Neuguinea häufig auftretendem Tumor, nachgewiesen (Epstein et al., 1964). EBV gehört zur Familie der Herpesviridae. Infektionen mit Herpesviren findet man beim Menschen sowie bei vielen Wirbeltierarten. Allen Herpesviren gemeinsam ist die Fähigkeit nach der Primärinfektion eine latente Infektion im Körper zu etablieren. EBV ist eins der häufigsten humanen Viren (Kieff, 2001; Opelz et al., 2009; Purtilo, 1987).

**Tabelle 1. Unterfamilie der Herpesviridae**

Alpha-Herpesviren	Beta-Herpesviren	Gamma-Herpesviren
HSV-1	CMV	EBV
HSV-2	HHV-6	HHV-8/KSHV
VZV	HHV-7	

Innerhalb der Herpesviridae unterscheidet man aufgrund biologischer Eigenschaften und Pathogenitätsmechanismen drei Unterfamilien (Tabelle 1). Die  $\alpha$ -Herpesviren sind gekennzeichnet durch ein breites Wirtsspektrum, eine rasche Virusvermehrung sowie einen lytischen Replikationszyklus. Sie persistieren in sensorischen Ganglienzellen. Humanpathogene Vertreter dieser Unterfamilie sind die Herpes-simplex- (HSV 1 und HSV 2) und die Varizella-Zoster-Viren. Im Gegensatz hierzu zeigen  $\beta$ -Herpesviren wie z. B. das humane Cytomegalievirus (CMV) einen relativ langsamen Vermehrungszyklus sowohl *in vivo* als auch *in vitro*.  $\gamma$ -Herpesviren

infizieren in erster Linie lymphoide Zellen, im Falle des Epstein-Barr Virus (EBV) B-Lymphozyten, in denen das Virus auch latent persistiert (Babcock et al., 1998).

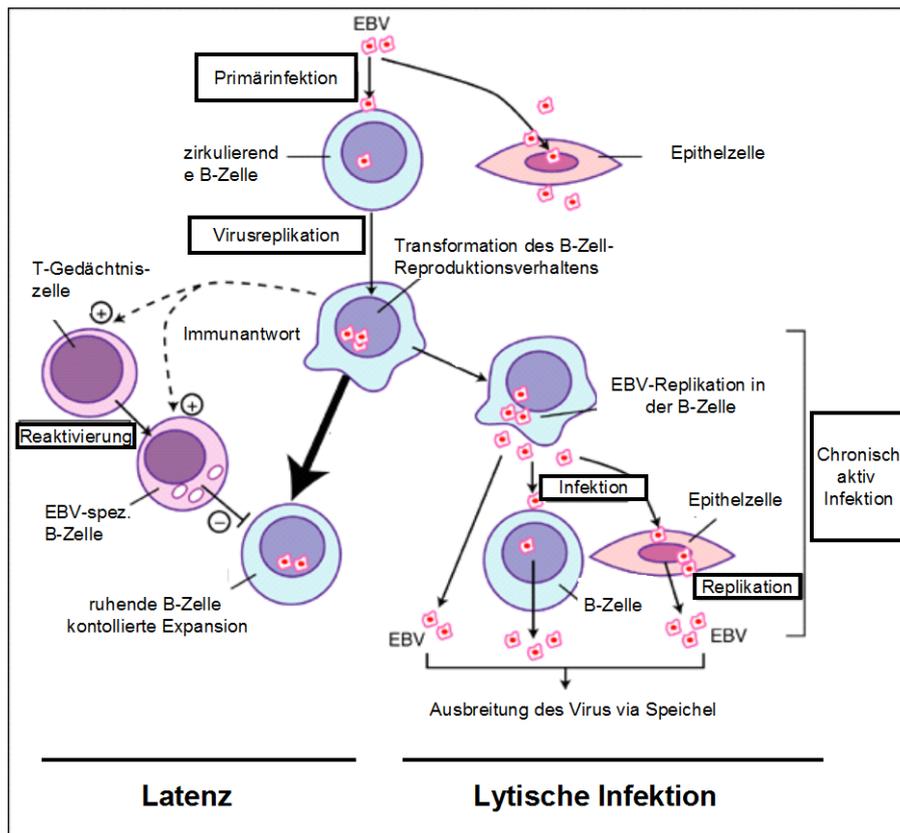
EBV besitzt ein Protein-Core mit einer doppelsträngigen, linearen DNA, die von einem Nukleokapsid aus 162 Kapsomeren umgeben ist. Zwischen Nukleokapsid und der lipidhaltigen Virushülle, die Glykoproteinspikes trägt, liegt ein Protein-Tegument. Dieses Tegument ist für die Infektiosität des Virus essentiell. Die Genomgröße von EBV beträgt 184 kbp.

EBV wird vor allem oral über den Speichel übertragen. Eine Übertragung durch Bluttransfusionen und Knochenmarktransplantationen ist auch möglich.

### **2.3.2 Vermehrungszyklus**

Die Fähigkeit der Herpesviren lebenslang im infizierten Wirt zu persistieren ist deren wichtigste Gemeinsamkeit. Die Virusvermehrung erfolgt im Zellkern. Es bestehen zwei Wege der Virusreplikation, latente und lytische Infektion (Dolcetti, 2007; Young and Rickinson, 2004) (siehe Abb.1). Im Gegensatz zur lytischen Vermehrung, in deren Verlauf die infizierten Zellen absterben, überleben latent infizierte Wirtszellen, da in diesem Stadium keine Nachkommenviren produziert werden und die Herpesviren verschiedene Strategien entwickelt haben, latent infizierte Zellen für das Immunsystem nicht erkennbar zu machen.

Die Eintrittspforte für die Erstinfektion ist der Rachenraum. Das Virus vermehrt sich zuerst in den Epithelzellen der Mundschleimhaut und der Speicheldrüsen. Danach kommt es zur Infektion der B-Lymphozyten der Tonsillen und des Waldayer-Rachenrings sowie des sonstigen lymphoiden Gewebes (Dolcetti, 2007). Die virale DNA gelangt daraufhin in den Zellkern der infizierten B-Zelle und zirkularisiert zu einem Episom (Abbildung 1). Danach verbleibt das Virusgenom lebenslang im Körper. Die Latenz wird periodisch durch Phasen der Reaktivierung und Rekurrenz (Virusneubildung) unterbrochen. Weltweit sind 90-95% der erwachsenen Bevölkerung infiziert (Cohen et al., 2000).



**Abbildung 1. Überblick einer EBV-Infektion.** Dargestellt ist hier eine Infektion bei Gesunden mit der latenten und lytischen Phase des Replikationszyklus modifiziert nach Expert Reviews in Molecular Medicine, Cambridge University Press 2001.

Im lytischen Infektionsmodus werden die viralen Gene in einer strengen zeitlichen Kaskade exprimiert. Zuerst entstehen die immediate early (sehr frühen) Virusproteine, sie ermöglichen die Expression der frühen Gene. Die frühen Gene induzieren die Expression der späten Gene, die für die Kapsidproteine und weitere Strukturproteine codieren und zum Virion zusammengebaut werden. Im latenten Infektionsmodus werden die Genome als multiple extrachromosomale Episome aufrechterhalten und bei Bedarf an die Tochterzellen weitergegeben (Dolcetti, 2007). Die Latenz wird anhand der unterschiedlichen Expressionsmuster der viralen Genprodukte in unterschiedliche Phasen (Latenzformen 0-III) unterteilt (Kieff, 2001). In der Latenz III nach der Infektion naiver B-Zellen werden alle 12 latenten Gene des EBV exprimiert. Dies sind die nukleären Proteine EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C und -LP ("EBV nuclear antigens") und die Membranproteine LMP1, LMP2A und LMP2B ("Latent membrane proteins"). Weiterhin findet man zwei nicht-polyadenylierte, nicht gespleißte RNA-Transkripte, EBER1 und EBER2 ("EBV-encoded small RNAs") und BARTs ("BamHI A fragment rightward transcripts"). Die drei weiteren Latenzphasen

zeichnen sich durch eingeschränkte Genexpression der viralen latenten Gene aus (Kieff, 2001).

Neben den Transkripten (EBER1, EBER2 und BARTs) werden in Latenz II die Proteine LMP1, LMP2A, LMP2B und EBNA1 und in Latenz I lediglich das Protein EBNA1 ausgeprägt. In der Latenz 0 werden EBERs, die BARTs, LMP2A und (EBNA1) exprimiert (Miyashita et al., 1997; Tierney et al., 1994). Die Latenz III konnte in PTLD Tumorzellen in vivo (Benkerrou et al., 1993; Bhatia et al., 1996), so wie auch in infektiösen Mononukleose nachgewiesen werden (Tierney et al., 1994).

### **2.3.3 Infektion mit EBV**

Im frühen Kindes- und Jugendalter kommt es meist zur Primärinfektion mit EBV durch seine Aufnahme über die oralen Schleimhäute („kissing disease“ oder „Infektiöse Mononukleose“, IM). Der Verlauf ist in der Regel asymptomatisch (Joncas et al., 1974). Eine Primärinfektion im Erwachsenenalter dagegen führt in bis zu 50% der Fälle zu einer Erkrankung mit massiver Proliferation von Lymphozyten („Infektiöse Mononukleose“, IM). Auch hier klingt meist die Erkrankung ohne Komplikationen innerhalb weniger Wochen ab. Sowohl der Verlauf einer symptomlosen wie auch IM Erkrankung, führt zur Bildung hoher Zahlen an T- und B-Gedächtniszellen, die dann vor einer erneuten Erkrankung schützen.

Das Virus verbleibt nach der Primärinfektion latent in ruhenden Gedächtnis-B-Zellen. Beim gesunden EBV-Infizierten sind etwa eine bis 50 von  $10^6$  B-Zellen latent mit EBV infiziert (Kieff, 2001). Das Virusgenom liegt in diesen Zellen in mehrfacher Kopie vor. Aus diesem B-Zell-Reservoir werden regelmäßig Viren freigesetzt, damit werden die Mundschleimhautepithelzellen infiziert. Hier findet eine lytische Replikation des Virus statt, weshalb das EBV ein Leben lang vom Seropositiven mit dem Speichel ausgeschieden wird.

Kommt es zur Reaktivierung des Virus im lytischen Infektionszyklus, werden infektiöse EBV-Partikel gebildet (Miyashita et al., 1997; Savard et al., 2000). Das EBV infiziert die B-Zellen, indem es einen Kontakt über das virale Membranglykoproteins gp350/220 mit dem von den B-Zellen exprimierten CD21 Protein (auch C3d-Komplementrezeptor genannt) herstellt (Nemerow et al., 1985; Tanner et al., 1987). Nach Bindung des Virus an die Zelloberfläche der B-Zelle, wird es durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen. Hierbei

spielt die Interaktion des viralen gH-gL-gp42-Komplexes mit dem HLA Klasse II Molekül der B-Zelle eine entscheidende Rolle (Haan et al., 2000; Haan and Longnecker, 2000). Das verursacht eine polyklonale Aktivierung der B-Zellen die ihrerseits dann eine virusspezifische zytotoxische CD8+ T-Zell-Antwort bewirken (Hislop et al., 2002). Die Immunantwort richtet sich gegen Zellen, die sowohl lytische als auch latente Proteine des Zellzykluses synthetisieren. Die potente antivirale T-Zell-Antwort resultiert in einer Regression infizierter B-Zellen.

Ein gesunder Organismus, der die Primärinfektion bereits überstanden hat, erlebt sowohl die latente als auch die lytische Phase aufgrund seines kompetenten Immunsystems in der Regel als symptomlos. Bei Immunsupprimierten führt eine Reaktivierung häufig zu malignen Erkrankungen.

#### **2.3.4 Besonderheiten bei einer Immunsuppression**

EBV-Infektionen bei Immunsupprimierten gehen oft mit Komplikationen einher, da die mangelhafte Immunantwort die Proliferation der infizierten B-Zellen nicht ausreichend kontrollieren kann. Die Immunsuppression unterdrückt die T-Zell-Antwort und somit ist die empfindliche Balance zwischen EBV und dem Immunsystem gestört. Infizierte Zellen können uneingeschränkt proliferieren und durch Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln weitere B-Zellen infizieren (Taylor et al., 2005). Im peripheren Blut von immunsupprimierten Patienten lässt sich ein Anstieg von latent infizierten Zellen wie auch eine EBV-Replikation nachweisen (Babcock et al., 1999). Es können sich in einigen Patienten durch EBV bedingten B-Zell Proliferationen lymphoproliferative Erkrankungen mit polyklonaler oder oligoklonaler Tumorbildung entwickeln (Pattle and Farrell, 2006; Vegso et al., 2011). Treten manifeste Lymphome nach einer Transplantation bei Immunsuppression auf, werden diese als Posttransplant-Lymphoproliferative Erkrankung (PTLD) bezeichnet.

#### **2.3.5 Diagnostiken von EBV**

Bei immunkompetenten Patienten beruht die Diagnostik auf dem Nachweis des Auftretens EBV-spezifischer Antikörper-Serologie. Standardmethoden sind der Immunfluoreszenztest, ELISA und der Immunoblot/Lineassay (Pearson, 1988). Gemessen werden Antikörper gegen VCA (IgG, IgM) und EBNA-1. Bei einer frischen

Infektion sind die IgM-Antikörper gegen VCA, aber keine Antikörper gegen EBNA-1. Zum direkten Nachweis wird die virale Nukleinsäure mittels PCR amplifiziert. Die Quantifizierung der EBV-Genomäquivalente im Blut ist bei der präemptiven Therapie des PTLD notwendig. Die Diagnose EBV-assoziiertes Tumore erfolgt histologisch oder zytologisch durch den Nachweis von EBV-Antigenen oder der EBER-RNAs.

Serologische Untersuchungen bei transplantierten Patienten sind nicht zuverlässig, da die Ergebnisse durch notwendigen Bluttransfusionen oder Gabe humaner Immunglobulinpräparate verfälscht werden. Darüber hinaus ist die Antikörper-Bildung unspezifisch und kreuzreaktiv und kann daher nicht verwendet werden. Immunsuppressive Patienten reagieren außerdem oft verzögert oder unzureichend auf eine Primärinfektion bzw. eine Reaktivierung von EBV (Swinnen, 2000).

Die quantitative PCR unter Verwendung der real-time Technologie wie z.B. Taq-Man-Technologie hingegen charakterisiert sich als ein sehr sensitives, nicht invasives und schonendes Verfahren, das schnell und mit großer Stabilität und Genauigkeit durchführbar ist und wird für transplantierten Patienten empfohlen. Die Bestimmung der Epstein-Barr-Virus-Genomzahl mittels quantitativer PCR aus Blut kann das mögliche Vorliegen einer PTLD geben (Jarrett, 2003).

## **2.4 Zytokine/ Zytokingenpolymorphismen**

### **2.4.1 Zytokine**

Zytokine sind lösliche Proteine oder Glykoproteine, die im komplexen Zusammenspiel zwischen den Komponenten des Immunsystems eine essentielle Rolle spielen (Janeway, 1997). Sie fungieren als Immunmodulatoren und chemische Botenstoffe zwischen den Zellen. Nach ihrer Bindung an den entsprechenden Rezeptorkomplex lösen sie pleiotrope Reaktionen aus. Diese Wirkungen können autokrin auf die sezernierende Zelle selbst oder parakrin auf andere Zellen wirken. Zytokine werden in die Familie der Interferone, Interleukine, und Tumor-Nekrose-Faktoren unterteilt.

Der klinische Ausgang vieler Infektions-, Autoimmun- oder Tumorerkrankungen scheint durch das allgemeine Gleichgewicht in den Produktionsprofilen der proinflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokinen beeinflusst zu werden (Janeway, 1997). Es konnte nachgewiesen werden, dass verschiedene Zytokine bei

der Regulierung der Schlüsselwege der B- und T-Zellenproliferation sowie bei der Immunität gegen intrazelluläre Pathogene eine Rolle spielen.

Während z.B. Transforming Growth Factor beta-1 (TGF- $\beta$ 1) und Interleukin (IL)-10 die B-Zellaktivierung und/ oder deren Wachstum (Li et al., 2006a) modulieren, tragen Interferon (IFN)-gamma und der Tumornekrosefaktor (TNF)-alpha mit ihren pro-inflammatorischen Aktivitäten (Kee et al., 2001; Massague et al., 2000) zur viralen Abwehr bei.

#### **2.4.2 Interleukin(IL)-10**

IL-10, ein Polypeptid bestehend aus 160 Aminosäuren, ist auf dem Chromosom 1 lokalisiert (Kim et al., 2008). IL-10 kann von verschiedenen Zelltypen gebildet werden: Makophagen/Monozyten, B-Lymphozyten, CD4+ T-Lymphozyten, eosinophile Leukozyten und Keratinozyten (Howard and O'Garra, 1992; Lalani et al., 1997). Im Serum gesunder Menschen kommt IL-10 in sehr geringer Konzentration vor (Gomez-Jimenez et al., 1995; Marchant et al., 1994). Bei einer Infektion induzieren sowohl Erreger-Antigene als auch pro-inflammatorische Zytokine (TNF-alpha, IL-1, IL-6, IL-12) die Produktion von IL-10 (Moore et al., 2001). Dagegen wird die Transkription von IL-10 durch IL-4, IL-13 und IFN-gamma gehemmt, aber auch IL-10 selbst kann durch eine negativen Rückkopplung die mRNA-Synthese hemmen (de Waal Malefyt et al., 1993). Der IL-10-Rezeptor wird von den meisten hämatopoetischen sowie einigen nicht hämatopoetischen Zellen (Fibroblasten, Epidermiszellen und Keratinozyten) exprimiert (Ho and Moore, 1994; Liu et al., 1997; Liu et al., 1994; Moore et al., 2001).

IL-10 spielt die Hauptfunktion bei der Begrenzung pro-inflammatorischer Reaktionen des Organismus. Es führt zu einer vermehrten Synthese von anti-inflammatorischen Molekülen (van Der Poll et al., 1997), es hemmt die Expression von *MHC-II*-Molekülen auf der Oberfläche des Makrophagen/ Phagozyten-Systems, wodurch zum einen die Antigenpräsentation vermindert ist und zum Anderen eine Abnahme der antigeninduzierten Aktivierung und Proliferation der CD 4+ T-Helferzellen erfolgt (Ding et al., 1993; Fumeaux and Pugin, 2002). Weiterhin beeinträchtigt IL-10 die Generierung von Sauerstoffradikalen und Stickoxiden in Monozyten und Makrophagen (Cunha et al., 1992; Gazzinelli et al., 1992; Kuga et al., 1996), es führt zu einer verminderten Expression von toll like receptor 4 (Muzio et al., 2000), IL-10

inhibiert die Fähigkeit von Phagozyten, die extrazelluläre Matrix zu verändern (Mertz et al., 1994; Niiro et al., 1995) und es hemmt die Bildung von Chemotaxinen. Es sind neben diesen anti-inflammatorischen Wirkungen auch einige pro-inflammatorische Effekte bekannt. IL-10 ruft eine vermehrte B-Zell-Proliferation, Differenzierung und Antikörperproduktion hervor (Go et al., 1990; Itoh and Hirohata, 1995; Rousset et al., 1992).

### **2.4.3 TGF-beta**

Zur TGF-beta-Superfamilie gehören über 30 Mitglieder, u.a. TGF-beta, Bone morphogenetic proteins (BMPs), Inhibin und Activin (Giacomini et al., 2006; Renner et al., 2004).

Es gibt drei Isoformen von TGF-beta. TGF-beta-1 mRNA wird in endothelialen-, hämatopoetischen- und Bindegewebszellen; TGF-beta-2 mRNA wird in epithelialen- und neuronalen Zellen und TGF-beta-3 wird primär in mesenchymalen Zellen, exprimiert. Diese drei Isoformen werden aus drei verschiedenen Precursor-Proteinen von 124 Aminosäuren synthetisiert. Bei TGF-beta handelt es sich um ein stark pleiotropes Zytokin, das in biologisch aktiver Form als Homodimer vorliegt. Dieses Protein hat eine Molakülmasse von ca. 13 kDa.

Die Zellprozesse werden durch eine Bindung an spezifische, membranständige Rezeptoren: TGF-beta-Rezeptor I, II, III, reguliert. Es handelt sich um transmembrane Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren. Durch die Bindung werden die SMAD-Transkription-Kofaktoren aktiviert. Diese akkumulieren im Zellkern und kontrollieren somit die Transkription der Zielgene. Eine einzelne Zelle kann sehr unterschiedlich auf eine Stimulation von TGF-beta durch Bildung eines TGF-beta-Rezeptorkomplexes reagieren. Dies beruht darauf, dass jede Zelle, abhängig von der Zelllinie, der Zellart und anderen Faktoren, ein breites Repertoire von SMADs aufweist, die abhängig vom zellulären Kontext verschiedene Zellantworten hervorrufen können. Aufgrund seines breiten Aktivitätsspektrums spielt TGF-beta eine zentrale Rolle bei der Hemmung der Epithelvermehrung, Stimulierung der extrazellulären Matrixsynthese durch Fibroblasten, Angiogenese, Schutz früher thymischer T-Zellen vor dem Zelltod, Regulation ausgereifter T-Zellen und Makrophagen und Tumorsuppression (Gelb, 2006; Hahn et al., 1996; Oomizu et al., 2004).

#### **2.4.4 IFN-gamma**

Man unterscheidet zwischen Typ1 Interferone (IFN-alpha und IFN-beta) und dem Typ 2 (Interferon-gamma). IFN-gamma wird als körpereigenes Gewebehormon v.a. von von CD4+-Effektor-T-Zellen, CD8+ T-Zellen und NK-Zellen sezerniert (Mosmann and Coffman, 1989; Perussia, 1991).

IFN-gamma ist ein Glykoprotein aus 143 Aminosäuren. Biologisch aktives IFN-gamma ist ein 34 kDa großes Homodimer. Der INF-gamma-Rezeptor besteht aus zwei alpha- und zwei beta-Untereinheiten, die durch die Bindung des Zytokins assoziieren (Valente et al., 1992).

IFN-gamma ist vor allem als proinflammatorisches Zytokin beschrieben. In den neueren Berichten wird dem ursprünglich proinflammatorischen Zytokin IFN-gamma eine protektive Rolle zugesprochen (Schroder et al., 2004). In verschiedenen Modellen für Autoimmunerkrankungen wurde IFN-gamma als protektives Zytokin charakterisiert (Ferber et al., 1996; Manoury-Schwartz et al., 1997; Vermeire et al., 1997; Zhang et al., 1999). IFN-gamma hat eine aktivierende Wirkung auf Makrophagen. Es führt zu einer besseren Verschmelzung von Phagosomen mit Lysosomen und fördert die Produktion des bakteriziden Stickstoffmonoxids und reaktiver Sauerstoffradikale. Außerdem induziert es antimikrobielle Peptide, 1 $\alpha$ -Hydroxylase in Makrophagen und überführt 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> in 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin D<sub>3</sub> ohne Produkthemmung der 1 $\alpha$ -Hydroxylase.

#### **2.4.5 TNF-alpha**

Humanes TNF-alpha ist ein 17 kDa großes und 157 Aminosäure langes Protein, das Dimere und Trimere bildet. Er ist ein multifunktionelles (pleiotropes), stark proinflammatorisches Zytokin (Dayer et al., 1985; Gamble et al., 1985) und wird vor allem von aktivierten Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen, T-Zellen und NK-Zellen ausgeschüttet. Die Stimulation dieser Zellen erfolgt durch bakterielle Lipopolysaccharide. LPS aktivieren über den TLR4/CD14 Rezeptor gemeinsam mit den TNF- $\alpha$  -Rezeptoren NF- $\kappa$ B, ein Transkriptionsfaktor für TNF- $\alpha$  und andere Cytokine. Der Rezeptor vermittelt Signale, die Zellproliferation oder Zelltod (Apoptose) induzieren. Diese Signale sind insbesondere notwendig für die normale körperliche Entwicklung und für die Funktion des Immunsystems. Eine übermäßige Aktivierung dieser Rezeptoren kann schwere Entzündungsreaktionen, Gewebszerstörung und Schock verursachen.

Die Produktion von TNF-alpha wird durch IL-6, TGF-beta, Vitamin D3, Prostaglandin E2, Cyclosporin A und Antagonisten des PAF (Plättchen aktivierender Faktor) gehemmt.

TNF-alpha ist ein zentraler Mediator der nicht-adaptiven Immunantwort, dem je nach Konzentration eine Vielzahl regulatorischer wie auch pathophysiologischer Funktionen zugeschrieben werden. Sein breites Spektrum umfasst folgende Aktivitäten: Apoptose, Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Ausschüttung anderer Zytokine sowie die Steuerung der Gerinnung und der Endothelzellfunktion. Als zentraler endogener Mediator spielt TNF-alpha auch beim endotoxischen Schock eine wichtige Rolle (Beutler et al., 1985; Tracey et al., 1986).

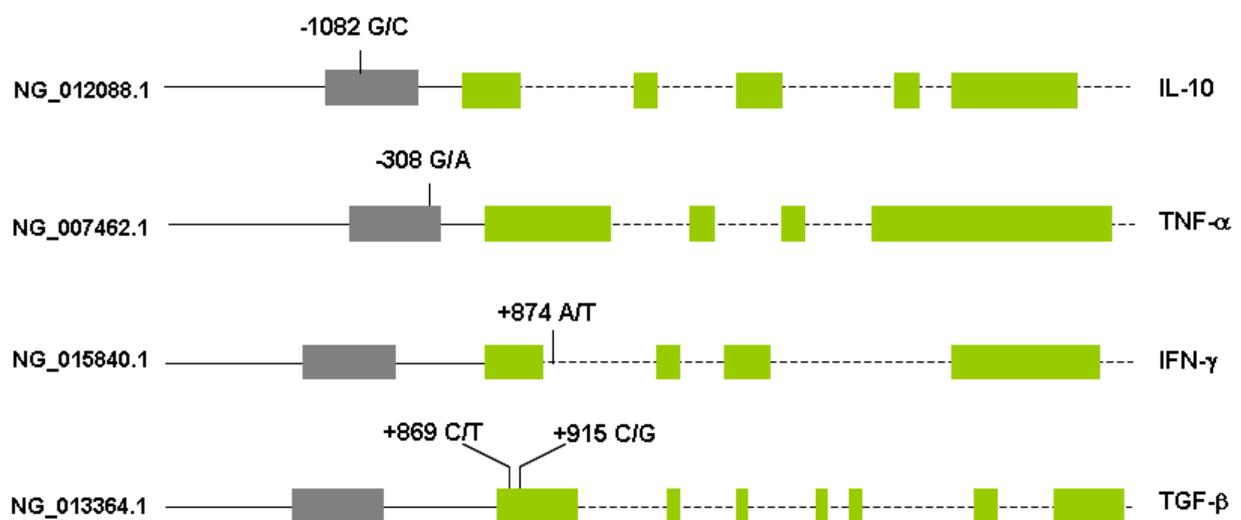
#### **2.4.6 Polymorphismus**

Ein wichtiger Aspekt zur Verbesserung der Therapiemöglichkeiten einer PTLD ist die Identifizierung von Risikofaktoren, die den Krankheitsverlauf oder die Inzidenz von PTLD beeinflussen. Zytokine sind entscheidend für die Zellkommunikation und sind daher möglicherweise als Schlüsselemente bei der An- und Abschaltung der Immunantwort zu sehen. Die große Bedeutung der Zytokine in der Entwicklung einer PTLD könnten Variationen innerhalb dieser Gene die Erkrankungen beeinflussen.

Als genetischer Polymorphismus wird das Vorhandensein von mehr als einem Allel eines Gens innerhalb einer Population bezeichnet. Dabei kann es sich um Substitutionen, Deletionen, Insertionen oder Amplifikationen einzelner Nukleotide oder ganzer Genabschnitte handeln, die in allen somatischen Zellen und den Keimzellen zu finden sind. Der Austausch einer einzelnen Base wird als Einzelnukleotidpolymorphismen (=„*single nucleotide polymorphism*“; SNP) bezeichnet (Loeffler et al., 2003). Der Unterschied zwischen Polymorphismus und Mutation liegt in der Häufigkeit, liegt die Frequenz der Genvariante höher als 1% spricht man von einem Polymorphismus, bei einer Frequenz unter 1% von einer Mutation.

Bei einer Reihe von Zytokingenen konnten genetische Varianten einschließlich SNPs nachgewiesen werden (Bidwell et al., 1999). Eine Regulierung der Zytokinspiegel erwies sich durch den Einsatz von genetischen Polymorphismen als genetisch kontrollierbar in Bezug auf die Codierungs- und Promotor-Sequenzen (Bidwell, et al., 1999). Dabei können die innerhalb der Promotorregionen der Zytokin-kodierenden

Gene einzelne Basensubstitutionen die Bindung von Transkriptionsfaktoren beeinträchtigen. Es folgt der Anstieg oder die Reduktion der mRNA und somit können die Regulation der Zytokinsekretion bei vielen Erkrankungen und der Verlauf von Organtransplantationen beeinträchtigen. Die im Folgenden beschriebenen Polymorphismen von -1082IL-10, -308TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 (+869TGF- $\beta$ /Codon 10, +915TGF- $\beta$ /Codon 25) und +874IFN- $\gamma$  Genen werden in dieser Arbeit untersucht und haben möglicherweise einen Einfluss auf das Auftreten von PTLD (Abb. 2).



**Abbildung 2. Schematische Darstellung der untersuchten Zytokin-SNPs.** Dargestellt sind die Polymorphismen von -1082IL-10, -308TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 (+869TGF- $\beta$ /Codon 10, +915TGF- $\beta$ /Codon 25) und +874IFN- $\gamma$  mit den resultierende Basenaustauschen in den codierenden (grüne Box), in nicht codierenden Sequenzen (gestrichelte Linie) oder Promotorbereich (graue Box).

Sowohl in codierenden und nicht-codierenden Bereichen des TNF- $\alpha$  Gen wurden viele „single nucleotide“ Polymorphismen (SNP's) gefunden. Sie befinden sich dem Gen vorgeschaltet an den Positionen -1031,-863,-857,-851,-488,-419,-376,-308,-238,-163 und -49 relativ gesehen zum Startpunkt der Transkription (Mira et al., 1999) (D'Alfonso and Richiardi, 1996). An diesen Stellen kommt es häufig zu einem Wechsel von Guanin (G) zu Adenosin (A). In Bezug auf den -308TNF- $\alpha$  Polymorphismus besteht ein Zusammenhang zwischen diesem und dem Auftreten von Infektionen, Autoimmunerkrankungen (Dermatitis Herpetiformis, verschiedenen Formen von Psoriasis), Karzinomen und Transplantatabstoßungen. So haben Organempfänger mit dem -308TNF- $\alpha$  A Allel ein höheres Risiko einer akuten

Abstoßungsreaktion von Herz- (Turner et al., 1997) und Nierentransplantaten (Sankaran et al., 1999). Ein weiterer Zusammenhang besteht zwischen homozygot -308 A Trägern und dem Auftreten des Trachoms. Personen mit diesem Genpolymorphismus in der Promotorregion haben ein 3,4-fach höheres Risiko am Trachom zu erkranken (Conway et al., 1997). Aber auch das Auftreten der chronischen lymphatischen Leukämie und das erhöhte Risiko für Malariapatienten eine cerebrale Malaria mit neurologischen Folgeerkrankungen zu entwickeln steht im Zusammenhang mit dem -308TNF- $\alpha$  Allel (Demeter et al., 1997).

Beim TGF-beta 1 Gen sind bisher acht Polymorphismen bekannt (Cambien et al., 1996; Derynck et al., 1987; Grainger et al., 1999). Drei sind in der Promotorregion lokalisiert, -988C>A, -800G>A und -509C>T, zwei befinden sich im Exon 1, +869TGF- $\beta$  mit dem Aminosäureaustausch Leu10Pro (CTG>CCG) und +915TGF- $\beta$  mit Arg25Pro (CGG>CCG), einer im Exon 5, Thr263Ile (ACC>ATC) und eine C-Insertion findet sich an Position +72 der 5'-Untranslatierten Region (5'-UTR). Die beiden Genpolymorphismen im Exon 1 sind graphisch in der Abbildung 2 dargestellt und werden in dieser Arbeit untersucht.

Turner und Mitarbeiter haben 3 Polymorphismen in der Promoterregion des IL -10-Gens identifiziert. Dabei handelt es sich um SNPs an den Positionen -1082, -819 und -519 (Turner et al., 1997). Es gibt eine signifikante Korrelation zwischen dem -1082IL-10 Promotorgenpolymorphismus und der IL -10 Expression, die beiden anderen Polymorphismen dagegen zeigten keinen Einfluss auf die IL -10 Expression. Der Polymorphismus in der Promotorregion an Position -1082IL-10 beeinflusst die transkriptionelle Aktivität des IL-10-Gens, wobei das G Allel mit einer vermehrten IL -10 Expression verbunden ist. Verschiedene Studien haben festgestellt, dass der IL -10 Polymorphismus eine klinische Relevanz beim Verlauf von entzündlichen Erkrankungen hat. Westendorp et al. wiesen nach, dass bei Patienten mit Meningokokkenerkrankungen, die eine Prädisposition für eine hohe IL-10 Produktion besitzen, ein ca. 20-fach erhöhtes Risiko für einen tödlichen Verlauf besteht (Westendorp et al., 1997).

Es wurde im ersten Intron des humanen INF- $\gamma$ -Gens SNP und CA Mikrosattelitenpolymorphismen nachgewiesen. Dieses SNP ist gekennzeichnet durch eine A/T Substitution an Position 874 (Abb. 2). Der INF- $\gamma$ -Genpolymorphismus an Position 874 beeinflusst die INF- $\gamma$  Expression (Mlynarczewska et al., 2004). Es gibt eine starke Assoziation zwischen einem INF- $\gamma$ -Gen- Polymorphismus und

rheumatoider Arthritis (Constantin et al., 2001), eine Beeinflussung der Helicobacter pylori-Infektion und eine Mitwirkung auf die Anfälligkeit für Oralen Lichen planus (Carrozzo et al., 2004).

Der Nachweis der Prädispositionsfaktoren für die Entwicklung der PTLD ist für das frühe Patientenmanagement und das Verständnis und Therapieansätze der immunsupprimierten Patienten von entscheidender Bedeutung.

## 2.5 Fragestellung

Unter Immunsuppression nach Organtransplantationen kann das Gleichgewicht zwischen viraler Aktivität und immunologischer Kontrolle gestört sein. Es kann zu viralen Reaktivierungen von peristierten Viren wie EBV kommen, die in einigen Prozent der Patienten zu EBV-assoziierten Lymphoproliferationen (PTLD; *post-transplant lymphoproliferative disease*) führen. Im komplexen Zusammenspiel zwischen den Komponenten des Immunsystems spielen Zytokine als Immunmodulatoren eine essenzielle Rolle. Insbesondere der Balance in der Produktion pro- und anti-inflammatorischer Zytokine durch die Immunzellen scheint den Verlauf dieser Erkrankungen bedeutend zu beeinflussen.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung genetischen Prädispositionen zur Entwicklung von PTLD bei Patienten nach einer Organtransplantation. Im Detail sollen genetisch determinierte Polymorphismen in kodierenden und nicht-kodierenden Bereichen der Zytokingene (IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) unter Verwendung von sequence-spezifischen PCR (Zytokin-SNP-PCR) untersucht werden mit der resultierenden Fragestellung:

Gibt es eine genetische Prädisposition zur Entwicklung von EBV -assoziierten Lymphomen bei Patienten nach einer Organtransplantation, die sich durch Einzelnukleotidpolymorphismen in Genomen pro- und anti-inflammatorischer Zytokine auszeichnen?

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

Alle in Tabelle 2 aufgeführten und verwendeten Chemikalien hatten jeweils den höchsten Reinheitsgrad. Sämtliche Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel wie Reaktionsgefäße oder Pipettenspitzen stammten von den Firmen Sarstedt (Nürnbrecht), Eppendorf (Hamburg), GE Healthcare (München), Becton Dickinson (Heidelberg) und Greiner (Nürtingen).

**Tabelle 2. Chemikalien und Kits**

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller (Ort)</b>
Agarose	Roth (Karlsruhe)
Desoxyribonukleosidtriphosphat	Invitrogen-Life Technologies (Mannheim)
Ethanol absolute	J.T. Baker (Deventer)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Aqua dest.	Fresenius (Bad Homburg)
PBS- Puffer (pH 7.19-7.59)	PAA Laboratories (Pasching)
RNase Away	Molecular BioProducts (San Diego, Mexico)
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Proteinase K	Invitrogen-Life Technologies (Mannheim)
AmpliTaq® DNA Polymerase	Perkin Elmer (Weiterstadt)
Cytokine Genotyping Primers Kit	One-Lambda (Canoga Park, USA)
dNTPs	Applied Biosystems/ Perkin Elmer (Weiterstadt)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
EDTA	Merck
Tris-Puffer	Merck

### 3.1.2 Geräte

**Tabelle 3. Geräte**

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller (Ort)</b>
GeneAmp 9700 Thermocycler	Applied Biosystems/ Perkin Elmer (Weiterstadt)
GeneAmp 9600 Thermocycler	Applied Biosystems/ Perkin Elmer (Weiterstadt)
NanoDrop® Spectrophotometer	PEQLAB (Erlangen)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
MS2 Minishaker	IKAI Wilmington,USA
Biofuge fresco	Heraeus/ Osterode

### 3.1.3 Patienten

Von 1765 Patienten mit einem soliden Organtransplantat sind 446 Patienten in die Studie aufgenommen worden (Transplantationsambulanz der Universitätsklinik, Charité). Die Studie wurde vom Ethikkomitee des Universitätsklinikums Charité in Berlin genehmigt. Aus dieser Patientengruppe entwickelten 38 organtransplantierte Patienten eine EBV-assoziierte PTLD. 408 Patienten befanden sich in der Transplantatkontrollgruppe.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 DNA-Isolation**

Den Patienten und Kontrollpersonen wurde venöses Blut entnommen. Die Isolierung von genomischer DNA aus Blutproben erfolgte durch Verwendung des QIAamp DNA Blood Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde in einem Volumen von 60µl eluiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **3.2.2 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren**

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure aus den extrahierten DNA-Proben erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) mithilfe des NanoDrop ND-100 Spektrophotometers (Nanodrop Technologies). Die Absorption der Lösung wurde bei zwei verschiedenen Wellenlängen gemessen: Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Liegt DNA vor, so entspricht eine OD 260 von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml (RNA: 40 µg/ml). Proteine hingegen besitzen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Die Reinheit der Nukleinsäure wurde über den Quotienten von 260 nm zu 280 nm Wert bestimmt, wobei der Quotient bei reinen Nukleinsäurelösungen einen Wert von mehr als 1,8 erreichen sollte. Beim NanoDrop Spektrophotometer konnten Konzentrationen von 25-200 ng/µl im Verhältnis A260/A280 von 1,65-1,80 gemessen werden.

### **3.2.3 Nachweis der Cytokin-SNP**

#### **3.2.3.1 Allgemeines Prinzip einer PCR**

Die PCR ermöglicht eine in-vitro-Amplifikation eines DNA-Fragmentes mit definierter Länge und Sequenz (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988). Eingesetzt werden spezifische Oligonukleotide (Primerpaare), die an flankierenden Regionen der zu amplifizierenden Sequenz binden und als Startpunkte der DNA-Replikation fungieren.

Die PCR gliedert sich in drei Schritte, die zyklisch wiederholt werden.

1. Zunächst wird die Vorlage-DNA (Template) in Anwesenheit der Primer, den vier dNTPs und der Polymerase bei 95 °C denaturiert. Dabei wird der DNA-Doppelstrang durch thermische Hitze in seine zwei Einzelstränge aufgeschmolzen. Ein hoher Überschuss an komplementären Primern verhindert beim Abkühlen die Wiedervereinigung der hochmolekularen DNA.
2. Dann erfolgt eine Abkühlung auf die Anlagerungstemperatur (Annealing), bei der die Primer spezifisch an die DNA binden. Hierbei hybridisieren die im Überschuss vorhandenen Primer an ihren komplementären DNA-Abschnitten. In Abhängigkeit vom GC (Guanosin Cytosin) der hybridisierenden DNA-Moleküle (Primer und Matrize) variiert die sogenannte Annealing-Temperatur: Je höher der GC-Gehalt, desto höher die Annealing-Temperatur.
3. Zuletzt erfolgt die Verlängerung der Primer (Elongation) durch eine DNA-Polymerase bei einer für das Enzym optimalen Temperatur (60°C bzw. 72 °C). Da die Produkte jeder Amplifikationsrunde als Vorlage für die nächste Amplifikationsrunde dienen, verdoppelt sich mit jedem Zyklus die Menge der gewünschten Ziel-DNA. Um eine erneute Polymerasezugabe nach jedem Denaturierungsschritt zu vermeiden, werden thermostabile Polymerasen, wie z. B. Taq-DNA Polymerase eingesetzt, die aus *Thermus aquaticus* isoliert wurde.

Dieser Reaktionszyklus von Denaturierung, Annealing und DNA-Synthese wird mehrmals wiederholt, so dass schließlich viele Kopien eines DNA-Fragments definierter Länge, entsprechend der Sequenz, die sich zwischen den Primern befindet, entstehen. Die Zielsequenz wird dadurch um den Faktor  $2^n$  vermehrt, wobei  $n$  gleich der Anzahl der Zyklen ist (Erlich, 1988).

### 3.2.3.2 Prinzip einer spezifischen Zytokin-SNP-PCR

Die Zytokin -SNP-PCR ist eine modifizierte PCR, in der spezifische Primer für ausgewählte Genotypen folgender Zytokine TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$  und IL-10 genutzt werden. In Tabelle 4 sind die einzelnen Nukleotide Positionen und der dazugehörige Genotyp/Phänotyp dargestellt. Bei IL-10 und TNF- $\alpha$  werden Promotorbereiche des jeweiligen Gens verwendet. Bei den Genen TGF- $\beta$ 1- und IFN- $\gamma$  liegen die Nukleotidpolymorphismen innerhalb des jeweiligen Gens.

Für die SNP-Analyse der Zytokine wurde eine Zytokin-Genotypisierungskit verwendet. Dieses Kit liefern sequenz-spezifische Oligonukleotid-Primer von

ausgewählten TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$  und IL-10 Nukleotidpolymorphismus für eine

Katalog	Bezeichnung	Zytokine	Anzahl	Anzahl PCR Reaktionen	D-mix Volumen	Taq-Polymerase
Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Zusätzlich beinhaltet das Testsystem ein Primerpaar für das humane $\beta$ -Globin-Gen als interne Kontrolle.						

**Tabelle 4. Zytokinpolymorphismen mit den unterschiedlichen Genotypen**

Gen	Position	Genotyp	
IL-10	-1082 (Promotor)	GG	homozygot
		AA	homozygot
		AG	heterozygot
TNF- $\alpha$	-308 (Promotor)	GG	homozygot
		AA	homozygot
		AG	heterozygot
IFN- $\gamma$	+874	AA	homozygot
		TT	homozygot
		AT	heterozygot
TGF- $\beta$	+869 (Codon 10)	CC	homozygot
		TT	homozygot
		TC	heterozygot
TGF- $\beta$	+915 (Codon 25)	CC	homozygot
		GC	homozygot
		GG	heterozygot

Für die Analyse werden DNA-Proben, rekombinanter Taq-Polymerase und einer speziellen dNTP-Puffermischung (D-mix) zusammen pipettiert. Jede PCR enthielt ein Well für die negative Kontrollreaktion, die das Vorliegen des internen PCR-Kontrollproduktes nachweist, das bei der PCR erzeugt wird. Die Primermengen sind auf die optimale Verstärkung von 100 ng der Proben-DNA ausgelegt, wenn sie in Kombination mit dem D-Mix, der vorgeschriebenen Menge an rekombinanter Taq-Polymerase und dem nachfolgend ausgeführten PCR-Reaktionsprofil verwendet werden.

CYTGEN	Zytokin- Genotypisierungs- platte	TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , IL10, INF- $\gamma$	24	16	180 $\mu$ l/ Test	1 $\mu$ l/ Test
--------	---	---	----	----	----------------------	--------------------

**Tabelle 5. Zytokin-Genotypisierungskit**

### *Testprinzip*

Die Zytokin-SNP-PCR Methodik beruht auf dem Prinzip, dass vollständig übereinstimmende Oligonukleotid-Primer bei der Amplifikation einer Zielsequenz effizienter eingesetzt werden können als ein nicht übereinstimmender Oligonukleotid-Primer mit rekombinanter Taq-Polymerase. Die Primer-Paare sind so ausgelegt, dass nur ein einzelnes Allele-Gen oder eine Gruppe von Allelen perfekt auf sie abgestimmt sind. Unter streng kontrollierten PCR-Bedingungen führen perfekt bindende Primerpaare zur Amplifikation von Zielsequenzen (d.h. positives Ergebnis), wogegen nicht komplementäre Primerpaare keine Amplifikation bewirken (d.h. negatives Ergebnis). Die Genotypisierung der Zytokingenpolymorphismus wurde mit einer hochspezifischen „Amplification Refractory Mutation System“ (ARMS) PCR durchgeführt. Dieses Protokoll basiert auf einer PCR, welche zwei Primer benutzt, die an jeweils ihrem 3`-Ende die komplementäre Base zum jeweiligen Polymorphismus in der Sequenz des Zytokin-Gens trägt:

Bei dieser Methode wird z.B. ein spezifischer „Sense-Primer“, der komplementär zum IL-10 Allel-A (Primer A), bzw. ein „Sense-Primer“, der komplementär zum IL-10-Allel G (Primer G) ist, in Kombination mit einem Antisense-Primer verwendet. Für jede zu untersuchende DNA-Probe müssen entsprechend zwei parallele Ansätze hergestellt werden, ein Ansatz mit dem Sense-Primer A und ein Ansatz mit dem Sense-Primer G. Die Anwesenheit eines PCR-Produktes definierter Länge in der Gelelektrophorese zeigt schließlich an, dass die komplementären Basen A oder G in der Promotorregion des IL-10-Gens des Patienten vorhanden sind.

Da die Verstärkung während der PCR-Reaktion durch verschiedene Faktoren (Pipettierfehler, schlechte DNA-Qualität, Gegenwart von Inhibitoren etc.) beeinträchtigt werden kann, wird jede PCR-Reaktion mit einem internen Kontroll-Primerpaar ergänzt. Als internen Kontrolle (Haushaltsgen) dient hier das humane  $\beta$ -Globin-Gens, mit dessen Hilfe man die Integrität der PCR-Reaktion überprüfen kann.

### 3.2.3.3 One-Lambda Zytokin-SNP-PCR

Die isolierten DNA-Proben werden in die Zytokin-SNP-PCR eingesetzt. Die SNP-PCR wurde unter folgender Zusammensetzung (s. Tabelle 6) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt. Die One-Lambda Cytokine-SNP-PCRs werden als Doppel-bestimmung durchgeführt.

**Tabelle 6. Zytokin-SNP-PCR Ansätze**

<b>SNP-PCR-Ansatz</b>		
Primermix (100 µM)	auf der Platte	
DNA-Matrize	1 µl	100 ng
TaqMan Universal PCR Master Mix:		
AmpliTaq Gold DNA Polymerase (5U/Ansatz), dNTPs	10 µl	
H <sub>2</sub> O (Merck)	ad 20 µl	

Die One-Lambda Zytokin-SNP-PCR wurde mit folgendem Programm mit dem PCR-Zyklergerät Perkin-Elmer 9600 oder 9700 durchgeführt (Tabelle 7).

**Tabelle 7. Allgemeines Zytokin-SNP-PCR-Programm (Zwei-Schritt-PCR)**

<b>Vorgang</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
1. Initialdenaturierung	96 °C	130 s

2. Primer-Anlagerung & Primer-Extension	63 °C	60 s
3. Denaturierung	96 °C	10 s
Schleife: von 2. zu 3.		10x
5. Primer-Anlagerung	59 °C	30 s
6. Primer-Extension	72 °C	50 s
7. Denaturierung	96 °C	10 s
Schleife: von 5. zu 7.		20x
8. Kühlung	4 °C	Pause

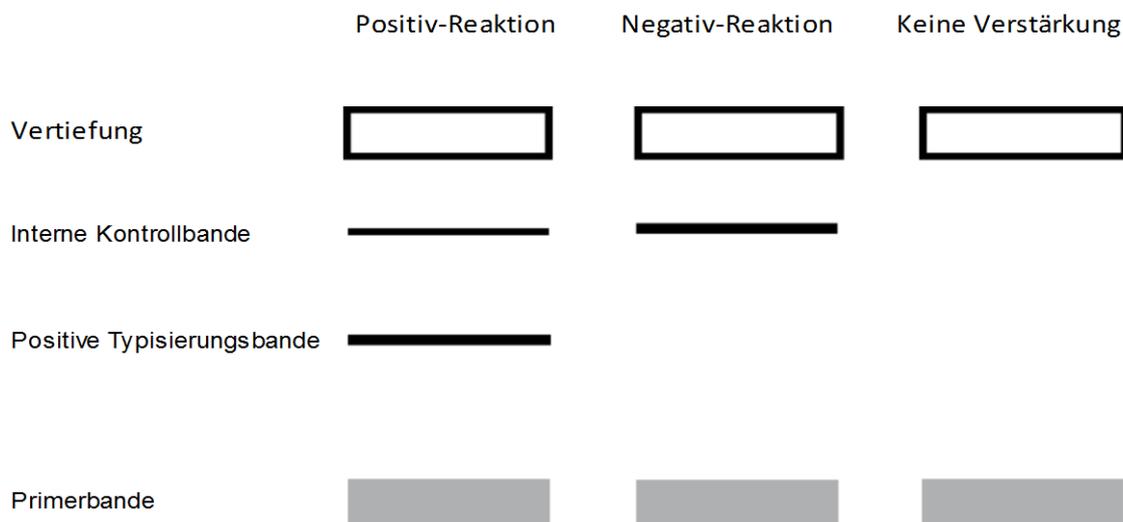
Nach Abschluss der PCR wurden für die weitere Analyse von jeder PCR-Reaktion 10 µl auf ein 2,5% Agarose-Gel im Gel System aufgetragen.

### 3.2.4 Agarosegelelektrophorese

Durch Gelelektrophorese können Nukleinsäurefragmente aufgrund ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Agarose bildet hierbei eine Netzstruktur, durch die die Nukleinsäuren in einem angelegten elektrischen Feld wegen ihrer negativen Ladung zur Anode wandern. Dabei können kleinere Fragmente schneller durch das Gel wandern als größere. Das Auflösungsvermögen hängt wesentlich von der Dichte der Netzstruktur und damit von der Agarosekonzentration ab. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 2,5 % verwendet. Als Elektrophorese-Puffer wurde 0,5 x TBE verwendet. Die Spannung betrug 140 – 150 V. Nach der Elektrophorese wurden die Gele zur Visualisierung der DNA 3 – 7 min in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) gefärbt. Nicht interkaliertes Ethidiumbromid wurde durch Waschen der Gele in Aqua dest. für 5 min entfernt. Zur Auswertung wurden die Gele auf einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 254 nm betrachtet und mit dem Videosystem EDAS 290 der Firma Kodak dokumentiert. Zur Größenbestimmung elektrophoretisch getrennter DNA-Fragmente wurde ein DNA-Molekulargewichtsstandard mit dem Gel aufgetrennt. Die Größenbestimmung erfolgte mit der 1 kb-Plus DNA Ladder™ der Firma Promega (Mannheim).

*Gelauswertung nach Zytokin-SNPs-PCR*

Nach Gelelektrophorese können durch das spezifische Bandenmuster der Proben die Allele direkt zugeordnet werden. Die obere Bande stellt die interne Kontrolle des  $\beta$ -Globin-Gens da. Eine Primerbande befindet sich ganz unterhalb. Zwischen diesen beiden Banden befinden sich die spezifischen Zytokin-Polymorphismus relevanten Banden, wie es in der schematischen Abbildung 3 dargestellt wurde.



**Abbildung 3. Darstellung eines schematischen Bandenmusters für die Gelauswertung.**

Eine interne Kontrollbande sowie eine weite nicht inkorporierte Primerbande dienen als Größenmarker. Alle zwischen den beiden Größenmarkern sichtbaren Banden sind als positive Typisierungsbanden einzustufen.

In Gegenwart eines positiven Typisierungsbandes (spezifische Verstärkung eines Zytokin-Allels) kann das Produkt des internen Kontroll-Primerpaars schwach ausgeprägt sein oder ganz fehlen, was auf Unterschiede von Konzentration und Schmelztemperatur bei den spezifischen Primerpaaren und dem internen Kontroll-Primerpaar zurückzuführen ist. Die amplifizierten DNA-Fragmente des spezifischen Zytokin-Primerpaars sind kleiner als das Produkt des internen Kontroll-Primerpaars, jedoch größer als das diffuse, nicht inkorporierte Primerband. So wird eine positive Reaktion für ein spezifisches Zytokin-Allel oder eine Allel-Gruppe auf dem Gel als DNA-Fragment zwischen dem internen Kontrollproduktband und dem nicht inkorporierten Primerband sichtbar gemacht.

### 3.2.5 Statistische Analysen

Das Auftreten eines Genotyps bleibt konstant, außer die Paarbildung ist nicht zufällig oder unangemessen oder es liegt eine Häufung von Mutationen vor. Daher wird die Häufigkeit von Genotypen und Allelen als "genetisches Gleichgewicht" bezeichnet. Dies ist ein Grundprinzip der Populationsgenetik. Für die Häufigkeit der Genotypen auf Basis der beobachteten Daten haben wir einen Schätzwert ermittelt. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurde mittels der Gleichung ( $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ ) für den Genotyp errechnet, wobei  $p$  die Häufigkeit des Auftretens des Allels A und  $q$  die Allelhäufigkeit des Allels B für einen Genotyp darstellt, der durch ein Allelepaar (A und B) kontrolliert wird. Es wurden 2x2-Kontingenztafeln erstellt und der Chi-Quadratstest mit sog. Yates-Korrektur zur Ermittlung der statistischen Signifikanz bei den Unterschieden in der Genotyp-Häufigkeit für Zytokin-Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) in der Kontrollgruppe sowie der Patientengruppe durchgeführt.  $P$  Werte von  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant eingestuft. Odds Ratios (OR) mit Konfidenzintervallen (KI) wurden zudem für signifikante Assoziationen berechnet. Hierzu wurde die online verfügbare interaktive Seite „<http://www.r-project.org/>“ für statistische Berechnungen (Analyse mittels einer 2x2 Kontingenztabelle) genutzt (R Core Team, 2012). Post-hoc-Vergleiche wurden mit Hilfe von multivariater Varianzanalyse (MANOVA) zwischen den Gruppen durchgeführt, um sicherzustellen, dass Faktoren wie die Posttransplantationsperiode, Art der nativen Erkrankung oder Art des Spenders keine Störvariablen darstellen und dass die genotyp-bezogene Assoziation ein unabhängiger Risikofaktor ist.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Selektion der Studienteilnehmer/Studienpopulation**

Von 1765 Patienten mit einem soliden Organtransplantat, die an die Transplantationsambulanz der Universitätsklinik Charité überwiesen wurden, sind 446 Patienten in die Studie aufgenommen. Aus dieser Gruppe entwickelten 38 organtransplantierte Patienten eine EBV-assoziierte PTLD. In der Transplantatkontrollgruppe befanden sich 408 Personen.

Die Einschlusskriterien bei der PTLD-Gruppe waren wie folgt:

- Alter über 18 Jahre
- Empfänger eines soliden Organtransplantats
- zum Zeitpunkt des Interviews noch lebend
- keine vorangegangene Krebsdiagnose
- EBV-assoziiertes B-Zellenlymphom
- PTLD-Ausbruch nach mehr als einem Jahr nach Vornahme der Transplantation

Einschlusskriterien für die Kontrollgruppe waren wie folgt:

- Alter über 18 Jahre
- stabile Transplantatfunktion
- keine EBV-Reaktivierung
- keine schwerwiegenden Erkrankungen
- keine hämatologischen Anomalien

Die Patienten der Kontrollgruppe waren gematcht, d.h. sie entsprachen der PTLD-Gruppe hinsichtlich der ethnischen Herkunft, des Geschlechts, des Alters und der Art des transplantierten Organs und der Immunsuppression. Die Studie wurde vom Ethikkomitee des Universitätsklinikums Charité in Berlin genehmigt. Alle Patienten unterschrieben nach Aufklärung über die Studieninhalte eine Einverständniserklärung. Innerhalb der PTLD-Gruppe lag das durchschnittliche Patienten- und Transplantatalter bei  $44,4 \pm 8,4$  Jahre beziehungsweise  $7 \pm 3,8$  Jahre (Tabelle 8). Insgesamt waren 66% der Studienteilnehmer männlichen Geschlechts und 34% weiblichen Geschlechts. Der Anteil der Nieren-, Herz- und Lebertransplantationen lag bei 66, 13 und 21 % der PTLD-Patienten.

Das durchschnittliche Patienten- und Transplantatalter lag in der Kontrollgruppe bei  $46,8 \pm 12$  Jahren beziehungsweise bei  $6,7 \pm 4,7$  Jahren. Insgesamt waren 57% der Studienteilnehmer männlichen Geschlechts und 43% waren weiblichen Geschlechts. Der Anteil der Nieren-, Herz- und Lebertransplantationen lag bei 70%, 11% und 19 % der Patienten der Kontrollgruppe.

Bei allen PTLD-Patienten wurde EBV assoziiertes Lymphom nachgewiesen. Die Diagnose Lymphom wurde auf der Grundlage histologischer Befunde und gemäß Klassifizierung der Weltgesundheitsorganisation WHO gestellt. Alle Lymphome waren auf B-Zellen zurückzuführen, 35 Patienten hatten ein Non-Hodgkin Lymphom (NHL) und die restlichen drei Patienten stellten sich mit Hodgkin Lymphom vor. Davon waren 18 Patienten in der Stufe I/II und 20 in der Stufe III/IV. Bei 21 Patienten handelte es sich um einen nodalen Befall. Hinsichtlich der histologischen Aggressivität des Lymphoms waren 7 indolent und 31 bösartig. Bei 36 Patienten erfolgte eine Expression des CD20-Antigens auf der Oberfläche der Lymphomzellen, bei den restlichen erfolgte keine CD20 Expression. Die Serum Laktat-Dehydrogenase Aktivität war bei 11 Patienten erhöht. Bezüglich der Primärtherapie fand bei 5 Patienten ein chirurgischer Eingriff statt, 10 Patienten wurden mit Chemotherapie und 23 mit Rituximab therapiert.

Die wichtigsten klinischen Befunde einschließlich der histologischen Eigenschaften, Krankheitsstadien, Therapien und Ansprechen auf die Therapie sind Tabelle 9 zu entnehmen.

Die Kontrollgruppe setzte sich aus 408 der PTLD-Gruppe gematchten Personen zusammen. Die Personen zeigten keine Anzeichen einer EBV-assoziierten PTLD, keine erhöhte EBV-Last oder hämatologischer Anomalien. Bei den Kontrollpatienten lag eine stabile Transplantatfunktion vor.

**Tabelle 8. Demographische Charakteristika in Fall- und Kontrollgruppe**

<b>Charakteristika</b>	<b>PTLD-Gruppe</b>	<b>Kontrollgruppe</b>
N	38	408
Geschlecht		
Männlich	25 (66)	233 (57)
Weiblich	13 (34)	175 (43)
Alter (in Jahren $\pm$ SD)	44,4 $\pm$ 8,4	46,8 $\pm$ 12,1
Transplantalter (in Jahren $\pm$ SD)	7 $\pm$ 3,8	6,7 $\pm$ 4,7
Transplantiertes Organ (%)		
Niere	66	70
Herz	13	11
Leber	21	19

*Alle p Werte waren nicht signifikant.*

**Tabelle 9. Klinische Daten, Diagnosen, Einteilung, Grunderkrankungen und Therapien der PTLD-Patienten.**

<b>Klinische Faktoren</b>	<b>PTLD-Patienten</b>
N	38
Histologie	
Hodgkin-Lymphom	3
Non-Hodgkin-Lymphom	35
Histologische Aggressivität	
Indolent	7
Bösartig	31
CD20 Expression	
Ja	36
Nein	2
Ann-Arbor-Klassifikation	
I/II	18
III/IV	20
Manifestation	
Nodal	21
Extranodal	17
Serumlaktat-Dehydrogenase	
Normal	27
Erhöht	11
Primärtherapie	
Chirurgischer Eingriff	5
Rituximab	23
Chemotherapie	10

Alle Patienten erhielten eine Dreifach-Immunsuppression (Cyclosporin oder Tacrolimus und Prednison sowie Antithymozytenglobulin oder AntiIL-2R-Antikörper als Induktionstherapie) oder Vierfachtherapie (Dreifachtherapie plus Mykophenolatmofetil) als Immunsuppressionstherapie.

Es gab keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Alters, der Art des Transplantats, des Geschlechts, der Immunsuppressionstherapie und des Transplantationsalters zwischen der Studien- und Kontrollgruppe.

#### 4.2 Auswertung der Ergebnisse anhand einzelner Beispiele

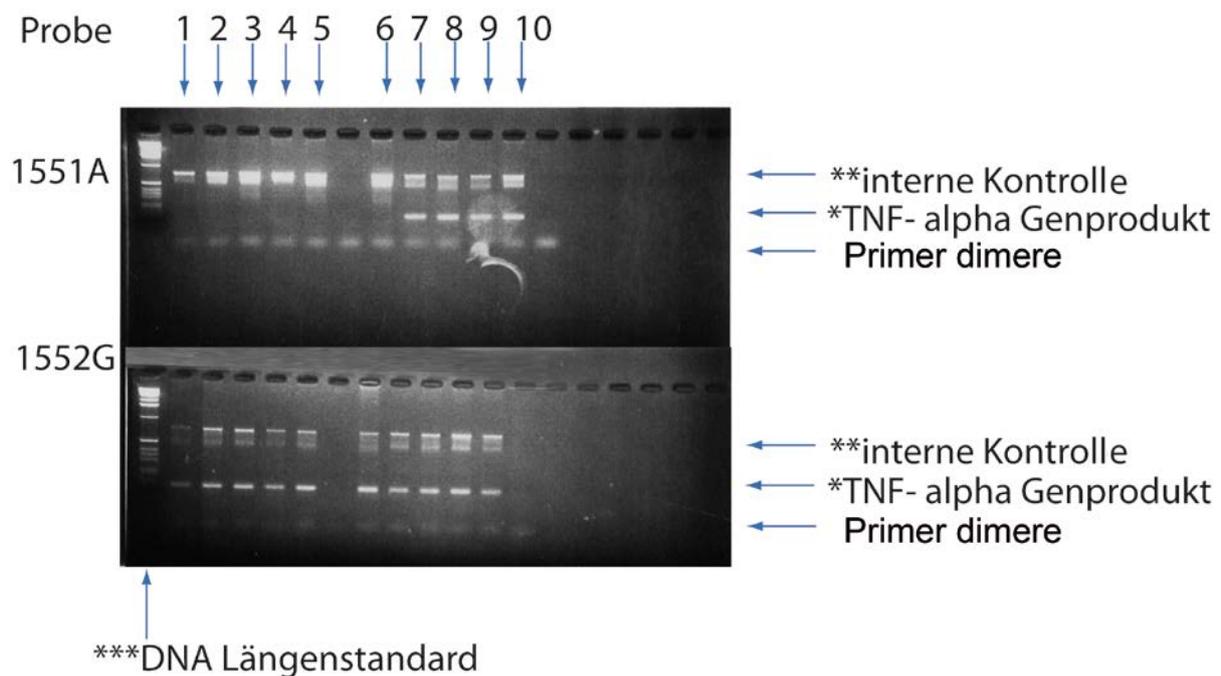
Es wurde die Assoziation zwischen der Entstehung einer PTLD und den Genotypen der unterschiedlichen Polymorphismen in den folgenden Zytokinen untersucht:

-1082 Interleukin-10 (IL-10), -308 Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), Transforming Growth Factor beta-1 (TGF- $\beta$ 1) Codon 10 und 25, und +874 Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ). Für den untersuchten Polymorphismus wurden die möglichen Genotypen in der Tabelle 10 zusammengefasst.

**Tabelle 10. Zytokin-Polymorphismen mit den entsprechenden Phänotypen**

Gen	Position	Genotyp	Phänotyp
IL-10	-1082	GG AA+AG	Hoch Niedrig
TNF- $\alpha$	-308	GG AA+AG	Niedrig Hoch
IFN- $\gamma$	+874	AA TT+AT	Niedrig Hoch
TGF- $\beta$	+869 (Codon 10)	CC TT+TC	Niedrig Hoch
TGF- $\beta$	+915 (Codon 25)	CC GC+GG	Niedrig Hoch

a. Assoziation zwischen TNF- $\alpha$  und PTLD



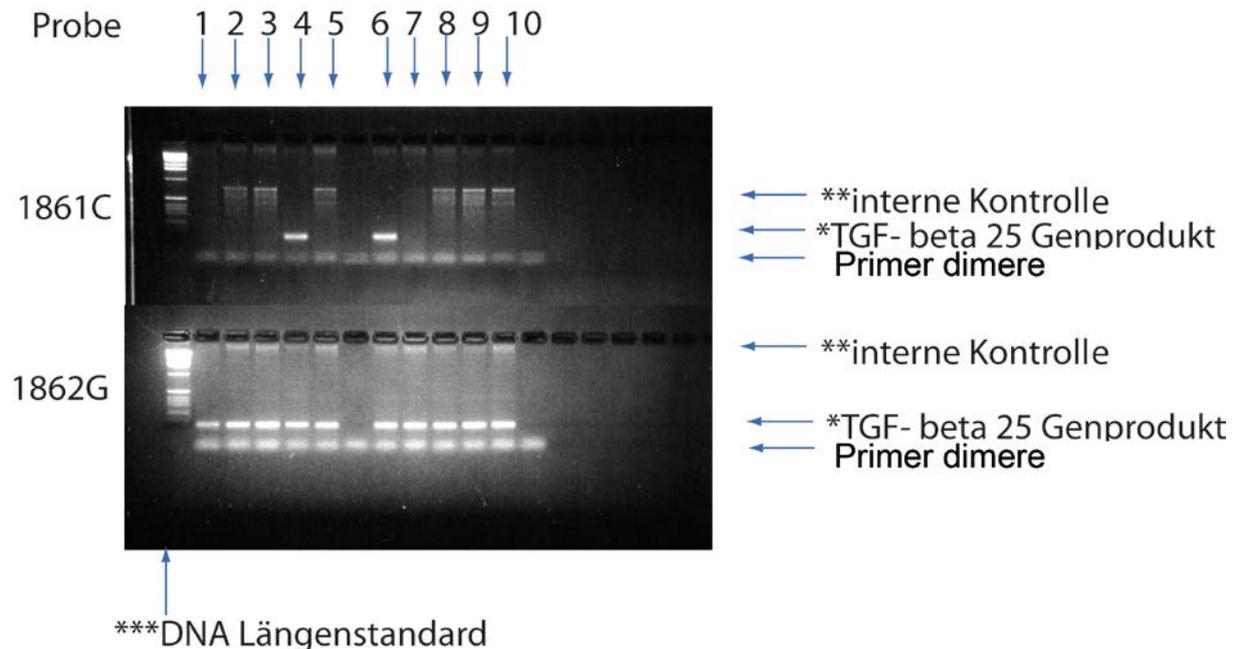
**Abbildung 4. Ergebnis einer -308 TNF-alpha One-Lambda-SNP-PCR.** Es sind 10 Patientenproben mit je 2 Ansätzen (A/G) dargestellt, sowie zwei Neg.-Kontrollen (H<sub>2</sub>O). Der Nachweis eines TNF-alpha Genproduktes (\*) in Ansatz A bzw. G zeigt an, dass in der jeweiligen Probe das A bzw. G Allel vorhanden ist. In jedem Ansatz ist zusätzlich die interne Kontrolle (\*\*) sichtbar. Dies stellt sicher, dass die PCR- Amplifikation erfolgreich war. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente wurde durch den Einsatz eines DNA-Längenstandards, der sich am linken Rand der Elektrophorese darstellt (\*\*\*) überprüft. Bei den untersuchten Patienten haben 4 den AG heterozygoten Genotyp und 6 Patienten den GG homozygoten Genotyp.

Die Abbildung 4 zeigt exemplarisch ein Agarosegel nach einer One-Lambda-SNP-PCR des untersuchten Zytokins TNF- $\alpha$ . Aufgetragen wurden 10 Patientenproben mit je 2 Ansätzen (A/G), sowie zwei Neg.-Kontrollen (H<sub>2</sub>O, letzte Bahn). Das obere Agarosegel stellt den Genotyp-A dar, während das untere Bild den Genotyp-G abbildet. In jedem Ansatz ist zusätzlich die interne Kontrolle als oberste Bande sichtbar. Dies stellt sicher, dass die PCR-Amplifikation erfolgreich war. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente wurde durch den Einsatz eines DNA-Längenstandards überprüft. Bei den dargestellten Patienten haben 4 den AG heterozygoten Genotyp und 6 Patienten den GG homozygoten Genotyp.

Untersuchungen aller Patientenproben zu TNF- $\alpha$ -SNP's haben gezeigt, dass unter allen 38 PTLD Patienten 29 Patienten homozygot GG waren und 9 Patienten hetero- bzw. homozygot für AA oder AG waren. Dagegen waren von den 406 Patienten aus der Kontrollgruppe 278 homozygot GG und 128 homozygot bzw. heterozygot für AA oder AG.

b. Assoziation zwischen TGF – beta-1 Codon 25 und PTLD

Analog zu der Analyse vom TNF- $\alpha$  wurde einer One-Lambda-SNP-PCR des Zytokins TGF- $\beta$ 1 untersucht. In Abbildung 5 wird ein exemplarisches Ergebnis einer Agarosegelelektrophorese von TGF- $\beta$ 1 dargestellt. Es sind 10 Patientenproben mit je 2 Ansätzen (G/C) sowie zwei Neg.-Kontrollen (H<sub>2</sub>O) dargestellt. Auch wenn die Gelelektrophorese nicht ganz optimal verlief, kann man die obere Bande für das  $\beta$ -Globin als die interne Kontrolle in allen Proben deutlich erkennen. Der Nachweis eines TGF-b1 Genproduktes mit den unterschiedlichen Genotypen –C (oberes Gel) und –G (unteres Gel) ist als mittlere Bande zu erkennen.



**Abbildung 5. Ergebnis einer +915 TGF-beta1 Codon 25 One-Lambda-SNP-PCR.** Es sind 10 Patientenproben mit je 2 Ansätzen (G/C) dargestellt sowie zwei Neg.-Kontrollen (H<sub>2</sub>O). Der Nachweis eines TGF-beta Genproduktes (\*) in Ansatz C bzw. G zeigt an, dass in der jeweiligen Probe das C bzw. G Allel vorhanden ist. In jedem Ansatz ist zusätzlich die interne Kontrolle (\*\*) sichtbar. Dies stellt sicher, dass die PCR- Amplifikation erfolgreich war. Die

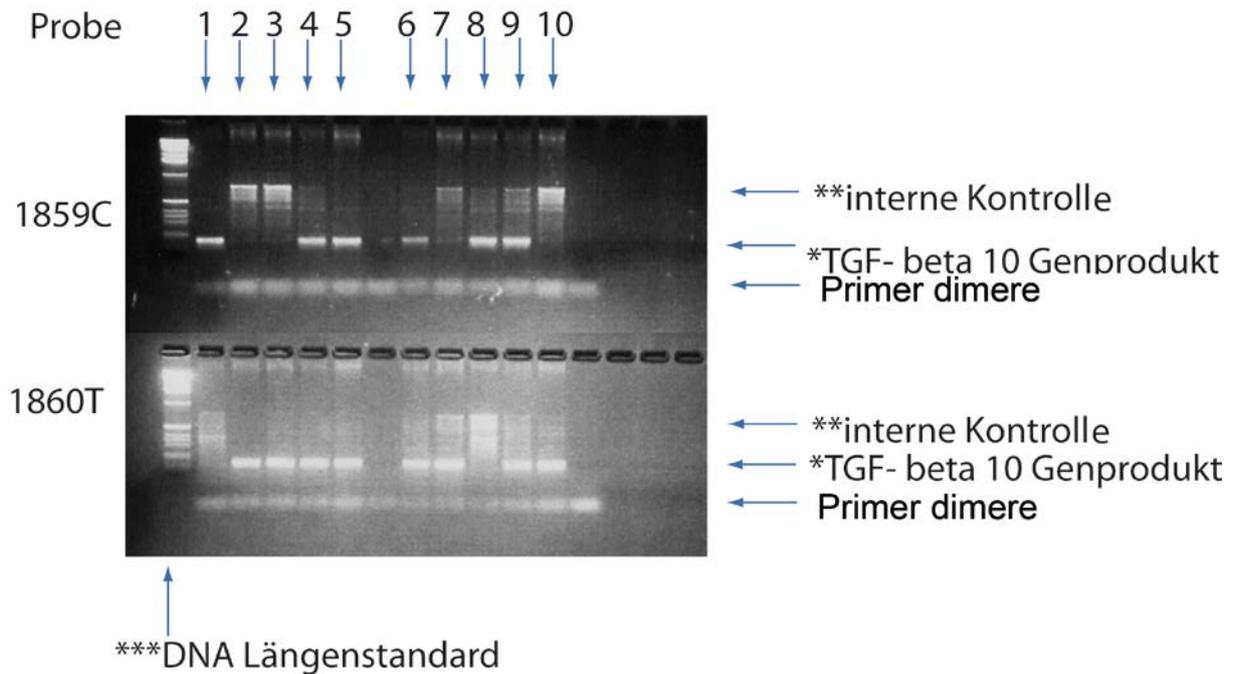
Größe der amplifizierten DNA-Fragmente wurde durch den Einsatz eines DNA-Längenstandards, der sich am linken Rand der Elektrophorese darstellt (\*\*\*) überprüft.

Von den hier untersuchten 10 Patienten weisen 8 den GG homozygoten Genotyp und 2 Patienten den CG heterozygoten Genotyp auf.

Wie in der Abbildung 5 dargestellt weisen von den hier untersuchten 10 Patienten zwei Patienten (mit der Nummer 2 und 4) den -CG heterozygoten Genotyp und die restlichen 8 Patienten den GG homozygoten Genotyp auf.

Das Ergebnis der Untersuchungen aller Proben zu +915 TGF-beta-1 (Codon 25) – SNP's zeigten, dass unter allen 38 EBV-assoziierte PTLD Patienten 14 Patienten homozygot CC waren und 24 Patienten hetero- bzw. homozygot für GC oder GG waren. Während sich bei der Kontrollgruppe sich ein anders Bild zeigt. Von den 407 Patienten aus der Kontrollgruppe waren 68 homozygot CC und 339 homozygot bzw. heterozygot für GG oder GC.

c. Assoziation zwischen TGF – beta-1 Codon 10 und PTLD



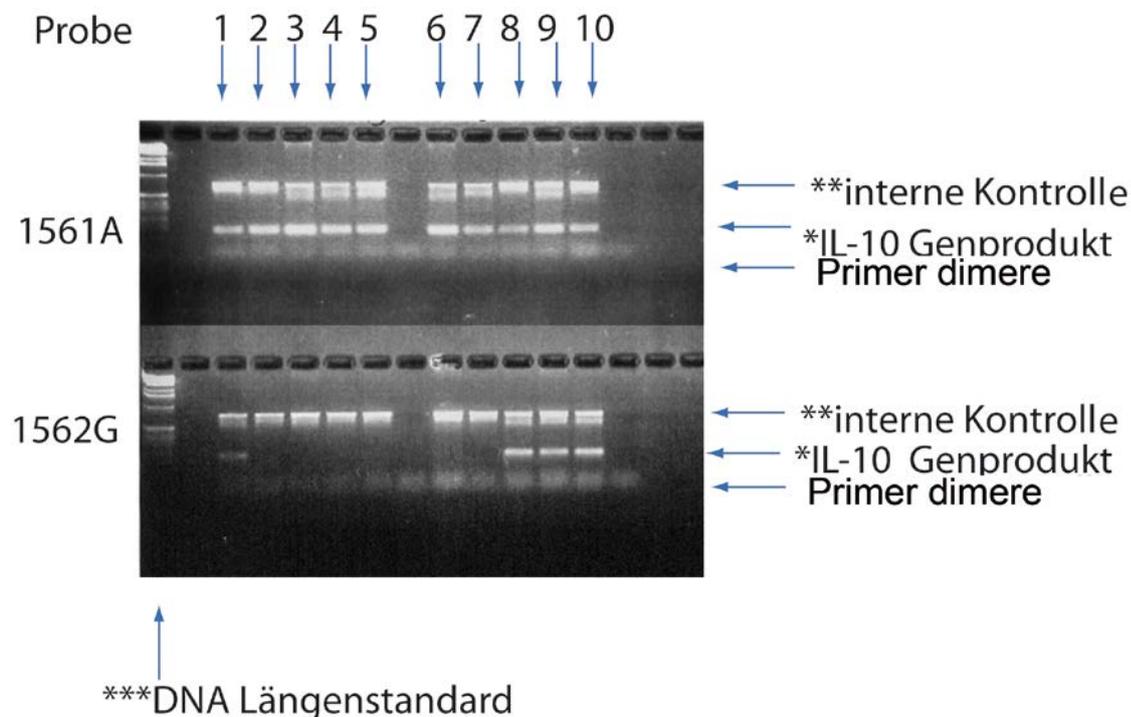
**Abbildung 6. Ergebnis einer +869 TGF-beta1 Codon 10 One-Lambda-SNP-PCR.** Es sind 10 Patientenproben mit je 2 Ansätzen (C/T) dargestellt, sowie zwei Neg.-Kontrollen (H<sub>2</sub>O). Der Nachweis eines TGF-beta Genproduktes (\*) in Ansatz C bzw. T zeigt an, dass in der jeweiligen Probe das C bzw. T Allel vorhanden ist. In jedem Ansatz ist zusätzlich die interne Kontrolle (\*\*) sichtbar. Dies stellt sicher, dass die PCR- Amplifikation erfolgreich war. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente wurde durch den Einsatz eines DNA-Längenstandards, der sich am linken Rand der Elektrophorese darstellt (\*\*\*) überprüft. Bei den hier untersuchten Patienten weisen 2 von 10 Patienten den CC homozygoten Genotyp, 4 den CT heterozygoten Genotyp und die restlichen den TT homozygoten Genotyp auf.

Wie auch beim TGF-β1 Codon25 wurde einer One-Lambda-SNP-PCR des Codon 10 des gleichen Zytokins TGF-β1 durchgeführt. In Abbildung 6 wird ein exemplarisches Ergebnis einer Agarosegelelektrophorese von TGF-β1 Codon10 dargestellt. Es sind 10 Patientenproben mit je 2 Ansätzen (G/C) sowie zwei Neg.-Kontrollen (H<sub>2</sub>O) dargestellt. Auf dem Agarosegel kann man die obere Bande für das β-Globingen als die interne Kontrolle in allen Proben deutlich erkennen. Der Nachweis eines TGF-β1 Genproduktes mit den unterschiedlichen Genotypen –C (oberes Gel) und –T (unteres Gel) ist als mittlere Bande zu erkennen. Wie in der Abbildung 6 dargestellt weisen 2

von untersuchten 10 Patienten den -CC homozygoten Genotyp, 4 den -CT heterozygoten Genotyp und die restlichen den -TT homozygoten Genotyp auf.

Untersuchungen zu TGF- $\beta$ -1 Codon 10 – SNP's haben gezeigt, dass unter allen 38 EBV positiven PTLD-Patienten 8 Patienten homozygot CC waren und 30 Patienten hetero- bzw. homozygot für TC oder TT waren. Dagegen waren von den 408 Patienten aus der Kontrollgruppe 75 homozygot CC und 333 homozygot bzw. heterozygot für TT oder TC.

d. Assoziation zwischen Interleukin-10 und PTLD

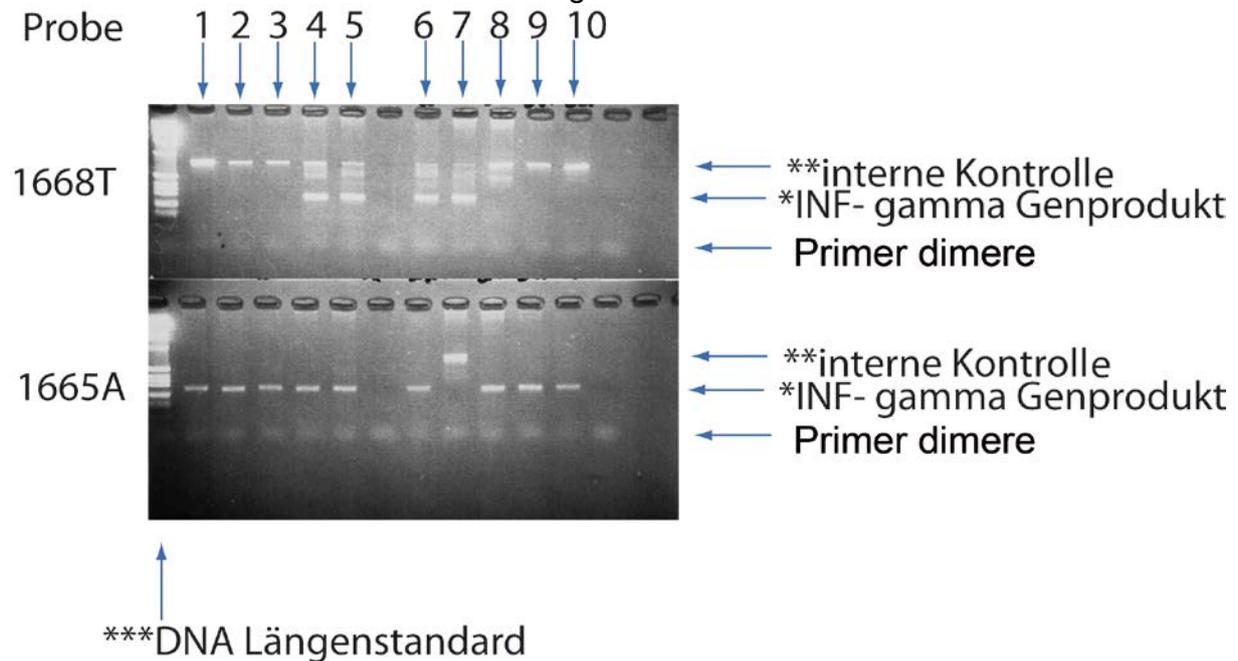


**Abbildung 7. Ergebnis einer -1082 Interleukin-10 One-Lambda-SNP-PCR.** Es sind 10 Patientenproben mit je 2 Ansätzen (A/G) dargestellt, sowie zwei Neg.-Kontrollen (H<sub>2</sub>O). Der Nachweis eines Interleukin-10 Genproduktes (\*) in Ansatz A bzw. G zeigt an, dass in der jeweiligen Probe das A bzw. G Allel vorhanden ist. In jedem Ansatz ist zusätzlich die interne Kontrolle (\*\*) sichtbar. Dies stellt sicher, dass die PCR- Amplifikation erfolgreich war. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente wurde durch den Einsatz eines DNA-Längenstandards, der sich am linken Rand der Elektrophorese darstellt (\*\*\*) überprüft. Von den Untersuchten Patienten besaßen 4 den heterozygoten AG-Genotyp und 6 den homozygoten AA-Genotyp.

In Abbildung 7 wird ein exemplarisches Ergebnis einer Agarosegelelektrophorese einer One-Lambda-SNP-PCR des -1082 Interleukin-10 dargestellt. Es sind 10 Patientenproben mit je 2 Ansätzen (A/G) sowie zwei Neg.-Kontrollen (H<sub>2</sub>O) dargestellt. Auf dem Agarosegel kann man die obere Bande für das Kontrollgen  $\beta$ -Globin als die interne Kontrolle in allen Proben deutlich erkennen. Der Nachweis eines IL-10 Genproduktes mit den unterschiedlichen Genotypen ist als mittlere Bande zu erkennen. Dabei stellen die Banden der Proben im oberen Gel den Polymorphismus mit einem Genotyp –A bzw. Genotyp –G im unteren Gel dar. Von den untersuchten Patienten besaßen 4 Patienten den heterozygoten Genotyp -AG und 6 Patienten den homozygoten Genotyp -AA.

Das Ergebnis der Untersuchungen aller Proben zu Interleukin-10 – SNP's haben gezeigt, unter allen 38 organtransplantierte Patienten mit EBV-assoziierte PTLD 14 Patienten homozygot -GG waren und 24 Patienten hetero- bzw. homozygot für AG oder AA waren. Dagegen waren von den 373 Patienten aus der Kontrollgruppe 200 homozygot GG und 173 homozygot bzw. heterozygot für AA oder AG.

e. Assoziation zwischen Interferon-gamma und PTLD



**Abbildung 8. Ergebnis einer +874 Interferon-gamma One-Lambda-SNP-PCR.** Es sind 10 Patientenproben mit je 2 Ansätzen (A/T) dargestellt, sowie zwei Neg.-Kontrollen (H<sub>2</sub>O). Der Nachweis eines Interferon-gamma Genproduktes (\*) in Ansatz A bzw. T zeigt an, dass in der jeweiligen Probe das A bzw. T Allel vorhanden ist. In jedem Ansatz ist zusätzlich die interne Kontrolle (\*\*) sichtbar. Dies stellt sicher, dass die PCR- Amplifikation erfolgreich war. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente wurde durch den Einsatz eines DNA-Längenstandards, der sich am linken Rand der Elektrophorese darstellt (\*\*\*) überprüft. 6 von den hier untersuchten Patienten haben den AA homozygoten Genotyp, 3 den TA heterozygoten Genotyp und einer den TT homozygoten Genotyp.

Die Abbildung 8 zeigt ein exemplarisches Ergebnis einer Agarosegelelektrophorese einer One-Lambda-SNP-PCR des +874 IFN-g-Gens. Es sind 10 Patientenproben mit je 2 Ansätzen (T/A) sowie zwei Neg.-Kontrollen (H<sub>2</sub>O) dargestellt. In allen Proben kann man die obere Bande für das Kontrollgen  $\beta$ -Globingen als die interne Kontrolle deutlich erkennen. Der Nachweis eines IFN-g Genproduktes mit den unterschiedlichen Genotypen ist als mittlere Bande zu erkennen. Dabei stellen die Banden der Proben im oberen Gel den Polymorphismus mit einem Genotyp –T bzw. Genotyp –A im unteren Gel dar.

Untersuchungen zu INF-g-SNP's haben gezeigt, dass unter allen 38 EBV-assoziierten PTLD Patienten 12 Patienten homozygot AA waren und 26 Patienten hetero- bzw. homozygot für -AT oder -TT waren. Dagegen waren von den 407 Patienten aus der Kontrollgruppe 132 homozygot -AA und 275 homozygot bzw. heterozygot für -TT oder -AT.

#### **4.2.1 Ergebnisse zu den einzelnen SNPs**

Die Genotypverteilung entsprach den Hardy-Weinberg-Kriterien. Nach dem Chi-Quadratstest mit Yates-Korrektur lag ein signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung der Kontrollgruppe und der der Patientengruppe mit PTLD für die -1082 IL-10 und TGF- $\beta$ 1 (Codon 25) SNPs vor (Tabelle 11). Die Häufigkeit der -1082 IL-10 GG Genotyp-Kodierung für die hohe phänotypische Zytokinproduktion war in der Kontrollgruppe signifikant höher als in der Patientengruppe mit PTLD (Odds-Ratio [OR] = 0,5; 95 % Konfidenzintervall [KI]: 0,23 - 1,0; *P-Wert* = 0,048). Der +915 TGF- $\beta$ 1 (Codon 25) CC Genotyp, welcher für die niedrige Zytokinproduktion indikativ war, wurde häufiger bei den PTLD-Patienten als in der Kontrollgruppe festgestellt (OR = 0,34; 95% KI: 0,16-0,76, *P-Wert* = 0,0022). Wir konnten keine signifikanten Unterschiede bei der 308 TNF- $\alpha$ , +869 TGF- $\beta$ 1 (Codon 10) sowie der +874 IFN- $\gamma$  Genotypverteilung feststellen (Tabelle 11).

Es konnten keine signifikanten Assoziationen zwischen einem der Zytokin-Genotypen und dem Krankheitsverlauf ermittelt werden. Analysen von Genotypverteilungen bezüglich des Stadiums oder der Malignität der Erkrankung ergaben keine signifikante Assoziation. Es ergab sich zudem keine Korrelation zwischen Zytokin-Polymorphismen und dem Ansprechen der Therapie.

**Tabelle 11. Häufigkeiten von Genotypen in einer Kohorte transplantierte Patienten.**

<b>Genotyp</b>	<b>Phänotyp</b>	<b>PTLD Patienten (n)</b>	<b>Kontroll- gruppe (n)</b>	<b>P Wert</b>	<b>Odds Ratio</b>	<b>95% CI</b>
-1082IL-10		38	373	0,048	0,5	0,23-1,0
GG	Hoch	14	200			
AA+AG	Niedrig	24	173			
-308TNF- $\alpha$		38	406	NS		
GG	Niedrig	29	278			
AA+AG	Hoch	9	128			
+874IFN- $\gamma$		38	407	NS		
AA	Niedrig	12	132			
TT+AT	Hoch	26	275			
TGF- $\beta$ C10		38	408	NS		
CC	Niedrig	8	75			
TT+TC	Hoch	30	333			
TGF- $\beta$ C25		38	407	0,0022	0,34	0,16-0,76
CC	Niedrig	14	68			
GC+GG	Hoch	24	339			

NS = Nicht signifikant

Zur Bewertung, ob -1082 IL-10 und +915 TGF- $\beta$  (Codon 25) SNPs unabhängige Risikofaktoren für die Entstehung von PTLD darstellen, wurde eine MANOVA-Analyse durchgeführt. -1082 IL-10 sowie +915 TGF- $\beta$ 1 (Codon 25) SNPs in Kombination mit dem Transplantationsalter, Patientenalter, Geschlecht, Art des Organs, Art der Grunderkrankung wurden mit dieser Analyse evaluiert.

Die Analysen bestätigten die Rolle der -1082 IL-10 und +915 TGF- $\beta$ 1 (Codon 25) SNPs als unabhängige Risikofaktoren für EBV-assoziierte Posttransplantationslymphome.

Es konnten keine weiteren Faktoren ermittelt werden, die zu dem Risiko des Entstehens von PTLD beitragen.

## 5. Diskussion

### *Charakteristika der PTLD Gruppe*

In dieser Arbeit wurde die Assoziation zwischen spät auftretender, EBV-assoziiertes PTLD und den genetischen Prädispositionen bestimmter zentraler immunologischer Zytokingene untersucht. Im Detail wurden genetisch determinierte Polymorphismen in kodierenden und nicht-kodierenden Bereichen der Zytokingene (IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) unter Verwendung von Sequence-Specific-Primer-PCR (SSP-PCR) untersucht.

Aufgrund des dramatischen Einflusses auf das Wohlergehen des Patienten zählt PTLD - trotz seiner relativ niedrigen Inzidenz - zu den wichtigen Komplikationen nach Transplantation eines soliden Organs. Aufgrund schlechter Überlebensstatistiken und begrenzter Therapieoptionen ist es wünschenswert Risikofaktoren zu identifizieren um einen Krankheitsausbruch zu verhindern.

Im Verlauf der letzten zwei Dekaden wurde bekannt, dass EBV eine wichtige Rolle in der Pathogenese von PTLD spielt (Jabs et al., 2001; Nalesnik and Starzl, 1994). Andere Variablen wie eine immunsuppressive Therapie, Art des transplantierten Organs, virale Koinfektion, Alter des Empfängers, ethnische Zugehörigkeit und Zeitraum seit der Transplantation werden ebenfalls als Risikofaktoren für die Entwicklung einer PTLD bezeichnet (McLaughlin et al., 2000; Smith et al., 2006). Die höchste beobachtete Lymphomrate trat bei transplantierten Patienten innerhalb der ersten 12 Monate auf, was als sogenannte früh einsetzende PTLD bezeichnet wird. Die Mehrheit der Fälle trat bei jungen Patienten auf (Alter < 25 Jahre) und wird mit einer aktiven EBV-Infektion assoziiert. Die proliferierenden B-Zellen sind polyklonal und die PTLD kann oftmals durch Absetzen der Immunsuppressiva geheilt werden. Allerdings birgt das Absetzen der Immunsuppressiva die Gefahr einer Organabstoßung. Das Verhalten und die Charakteristika bei spät auftretender PTLD (Entwicklung einer PTLD nach mehr als 1 Jahr post transplantationem) sind meistens anders ausgeprägt (Shahinian et al., 2003). Die Patienten sind für gewöhnlich älter, die Lymphome sind monomorpher Natur und die Reduktion oder das Absetzen der Immunsuppressiva haben keine positive Wirkung.

In unserer Studie konzentrierten wir uns auf die Auswertung der genetischen Risikofaktoren bei der Entwicklung der spät auftretenden EBV-assoziierten PTLD. In

unserer Studie lag das durchschnittliche Patientenalter der PTLD-Gruppe bei  $44,4 \pm 8,4$  Jahre und das Transplantatalter bei  $7 \pm 3,8$  Jahre (Tabelle 7; S. 31). Die Patienten der Kontrollgruppe entsprachen der PTLD-Gruppe hinsichtlich der ethnischen Herkunft, des Geschlechts, des Alters und der Art des transplantierten Organs und der Immunsuppression.

### *Unterschiedliche genetische Prädispositionen der PTLD*

Angesichts der festgestellten pathophysiologischen Rolle von bestimmten pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokinen bei der Immunabwehr und unter der Voraussetzung dass einzelne Zytokin-SNPs die Zytokinexpression beeinflussen können, haben wir die Polymorphismen von -1082IL-10, -308TNF, TGF- $\beta$ 1 (Codon 10, 25) und +874IFN- $\gamma$  Genen in einer Kohorte von Empfängern solider Organtransplantate mit und ohne EBV-assoziiertes, spät auftretender PTLD analysiert.

Wir stellten eine signifikante Korrelation von -1082IL-10 und +915TGF- $\beta$ 1 (Codon 25) Genotypen mit EBV-assoziiertes PTLD fest. Die molekular-genetische Analyse von Einzelnukleotid- Polymorphismen zeigte, dass +915TGF- $\beta$ 1 (Codon 25) CC-Genotyp signifikant häufiger bei Patienten mit PTLD vorlag als in der Kontrollgruppe (OR=0,34; 95% Konfidenzintervall 0.16 zu 0.76; *P*-Wert=0,0022). Zusätzlich war die Häufigkeit von -1082 IL-10 GG-Genotyp in der Kontrollgruppe höher als bei Patienten mit PTLD (OR=0,5; 95 % Konfidenzintervall 0.23 zu 1.0, *P*=0,048). Die vorliegende Studie bekräftigt eine mögliche Rolle von genetisch bedingten Prädispositionsfaktoren als Determinanten für eine spät auftretende PTLD bei Patienten mit soliden Organtransplantaten. Nach unserer Kenntnis ist dies die erste Beschreibung der erwähnten Assoziation.

## *Einfluss einer +915 TGF- $\beta$ 1 Prädisposition auf PTLD*

TGF- $\beta$ 1 ist ein pleiotropes Zytokin, welches aufgrund seiner Auswirkungen auf den Metabolismus (Li et al., 2006b) der Immun- und Bindegewebszellen eine ausgeprägte Rolle bei hämatologischen und Bindegeweberkrankungen spielt.

Es ist bekannt, dass die Produktion von TGF- $\beta$  in seiner Kodierungssequenz einem genetischen Kontrollmechanismus durch die Polymorphismen unterliegt. In unsere Studie untersuchten wir den +915TGF- $\beta$ 1 (Codon 25) GG Genotyp, der sich im Exon 1 befindet und zu einem Aminosäureaustausch von Arginin (CGG) zu Prolin (CCG) führt. In einer Arbeit von Awad et al. (1998) wurde beschrieben, dass in vitro stimulierte Leukozyten von Patienten mit einem ArgArg Genotyp in Codon 25 signifikant mehr totales TGF-beta1 produzieren als Träger des 25 ArgPro Genotyps (Awad et al., 1999). Deshalb wird der +915TGF- $\beta$ 1 (Codon 25) GG Genotyp mit einer erhöhten Proteinexpression assoziiert (Massague et al., 2000).

In den letzten Jahren erkannte man in zunehmendem Maße die Rolle von TGF- $\beta$  als einen starken Tumorsuppressor in verschiedenen Epithel- und anderen Zelltypen (Massague et al., 2000). Heute ist TGF- $\beta$  für seine Fähigkeit bekannt, als Tumorsuppressor und Inhibitor von B-Zellenproliferation zu wirken (Kee et al., 2001; Massague et al., 2000).

Der tumorunterdrückende Effekt ist besonders in der frühen und gutartigen Phase ausgeprägt (Tan et al., 2006). Kürzlich aufgezeigte niedrigere TGF- $\beta$ 1 Plasmaspiegel bei Patienten mit EBV-assoziierten Karzinomen des Nasen-Rachenraumes (NPC) im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe legt eine Schutzfunktion dieser Zytokine bei der Entstehung von NPC nahe (Tan et al., 2006). Der TGF- $\beta$  (Codon 25) GG Genotyp ist bekanntermaßen assoziiert mit einer erhöhten Plasmaexpression (Massague et al., 2000).

Zudem hemmt TGF- $\beta$  die B-Zellenproliferation, induziert eine Apoptose von unreifen oder ruhenden B-Zellen und blockiert die B-Zellenaktivierung (Nalesnik and Starzl, 1994). In unsere Studie zeigten die molekular-genetische SNP-Analysen, dass +915 TGF- $\beta$ 1 (Codon 25) CC-Genotyp, das eine niedrige Zytokinproduktion kodiert, signifikant häufiger bei Patienten mit PTLD vorlag als in der Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse unserer Studie, die aufzeigen, dass der TGF- $\beta$ 1 (Codon 25) GG Genotyp als Schutzfaktor gegen die Entwicklung einer PTLD gewertet werden kann, stimmen mit diesen Daten überein. Angesichts des Potentials von TGF- $\beta$ 1 bei der

Inhibition einer unkontrollierten Proliferation von B-Zellen bei Transplantationspatienten mit einer EBV-Infektion verleitet dies zu der Spekulation darüber, dass ein Fehlen von inhibitorischen biologischen Aktivitäten eine ungenügende Kontrolle der pathologischen Proliferation von B-Zellen bewirkt und zu der Entwicklung von EBV-assoziierten Lymphomen beiträgt.

### *Einfluss einer -1082 IL-10 Prädisposition auf PTLD*

Auf Grund der besonderen Bedeutung von SNP - 1082 A/G im IL - 10- Gen-Promotor, wie in aktuellen Arbeiten gezeigt (Cunningham et al., 2003; Mormann et al., 2004; Turner et al., 1997), wurde dieser SNP in der vorliegenden Arbeit mit der real-time PCR in dieser PTLD-Kohorte analysiert. In unsere Studie war die Häufigkeit der -1082 IL-10 GG-Genotyp-Kodierung für die hohe phänotypische Zytokinproduktion in der Kontrollgruppe signifikant höher als in der Patientengruppe mit PTLD (OR=0,5; 95% CI 0.23 zu 1.0, P=0,048). Dieser signifikante Anstieg der IL-10 (-1082) GG Genotyp-Häufigkeit bei der Kontrollgruppe legt eine Schutzfunktion dieses Genotyps bei der PTLD nahe.

IL-10 ist ein Wachstumsfaktor für B-Lymphozyten (Benjamin et al., 1992). Durch Abstammung der meisten PTLD aus B-Lymphozyten könnte IL-10 eine Wirkung auf die Lymphomzellen haben, was die Vermehrung der Lymphomzellen anregen würde und so den Verlauf der Lymphomerkrankung beschleunigen könnte. Ausserdem ist IL-10 ein immunsupprimierendes Zytokin (Moore et al., 2001). Die hohe Expression in Lymphompatienten könnte somit dazu beitragen, dass die Tumorzellen nicht durch das Immunsystem eliminiert werden können und dies zu einem schlechteren klinischen Verlauf führt. IL-10 ist auch an der Differenzierung von T-Lymphozyten zu den immunsuppressiven Tregs beteiligt (Moore et al., 2001). IL-10 ist ein wichtiges Zytokin, das eine anti-inflammatorische Wirkung in Bezug auf die Inhibition der Th1 Immunantwort sowie der Monozytenfunktion hat. Es liegen zudem hinreichende Beweise dafür vor, die die Rolle von IL-10 bei der Lymphomgenese einschließlich der EBV-assoziierten PTLD unterstützen (Muti et al., 2003). Eine in-vitro Studie unter Verwendung von mononuklearen Zellen aus peripherem Blut legt nahe, dass der IL-10 (-1082) GG Genotyp mit einer stärkeren Zytokinproduktion zu assoziieren ist als andere Genotypen (Turner et al., 1997).

Auf der Grundlage dieser Beobachtung und unter Berücksichtigung der lymphogene Eigenschaften von IL-10 erscheint unsere ermittelte Korrelation zwischen dem IL-10

(-1082) GG Genotyp und der Schutzfunktion gegenüber PTLD als schwierig zu erläutern. Jedoch ist bekannt, dass IL-10 die Antikörperreaktion verstärkt und so die humorale Immunität (Rousset et al., 1992) verstärkt. Daher können wir annehmen, dass hohe IL-10 Spiegel zu einer Verbesserung der Immunität gegen EBV führen und eine EBV Reaktivierung verhindert, welche ein kausaler Faktor für die PTLD ist. IL-10 steuert zudem in hohem Maße die IL-6 Sekretion von Makrophagen und Lymphozyten. IL-6 ist ein wichtiger Überlebens- und Proliferationsfaktor der B-Zellen. Ein hoher Spiegel an IL-10 kann zu einer Begrenzung der die B-Zellen unterstützenden IL-6 Sekretion führen. Eine andere mögliche Erklärung für die negative Korrelation zwischen dem -1082IL-10-GG Genotyp und PTLD könnte eine Verbindung zwischen den Polymorphismen von IL-10 GG und TGF-beta GG sein. Diese Verbindung wurde jedoch durch die entsprechenden statistischen Tests ausgeschlossen.

Unsere Ergebnisse decken sich mit weiteren, kürzlich durchgeführten Fall-Kontrollstudien mit einer großen Kohorte einer allgemeinen Population mit und ohne Non-Hodgin-Lymphom. Diese Studien zeigten eine Korrelation von IL-10 Promoter-Genotyp-Kodierung für eine niedrige IL-10 Produktion und Prädisposition für maligne Formen des Lymphoms (Lan et al., 2007; Purdue et al., 2007).

Zusätzlich zeigte eine australischen Studie der Arbeitsgruppe von Cunningham, dass die Frequenz des IL - 10 - 1082 A Allels, welches als "niedrig exprimiert" - Allel bekannt ist, war bei Patienten mit aggressivem Non-Hodgin-Lymphom signifikant höher im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Cunningham et al., 2003). Ebenso waren die Frequenzen der proximalen Haplotypen ATA und ACC (SNP - 1082, - 824 und 597), welche als "niedrig exprimiert" - Haplotypen bekannt sind, in der Patientengruppe signifikant höher im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Cunningham et al., 2003).

Über die Genvariation IL-10-1082 im Zusammenhang mit malignen Lymphomerkrankungen gibt es verschiedene Studien. Die Arbeitsgruppe von Lech - Maranda dagegen kam zu dem Ergebnis, dass das IL - 10 - 1082 G- Allel in einer französischen Patientengruppe mit aggressivem Non-Hodgin-Lymphom gehäuft auftrat.

Diese Diskrepanz deutet darauf hin, dass weitere bisher unbekannte Genvariationen im Bereich des IL - 10- Gens oder auch andere Zytokine mit dem Krankheitsverlauf assoziiert sein könnten. Mörmann et al. zeigten, dass die IL-10- Expression nicht

allein von dessen Gen - Promotor - Polymorphismus abhängt, sondern auch von der Art der Stimuli, was wiederum den Verlauf der Erkrankung beeinflussen würde (Mormann et al., 2004). In verschiedenen Studien konnte sowohl eine Erhöhung als auch Reduktion einer IL-10 Sekretion den Verlauf maligner Lymphomerkrankungen beeinflussen (Benjamin et al., 1992; Emilie et al., 1992).

### *Limitierung der Studie*

Eine wesentliche Einschränkung dieser Studie ist die begrenzte Patientenzahl in der PTLD-Gruppe. Da die Inzidenz der PTLD und insbesondere der spät auftretenden EBV-assoziierten PTLD relativ niedrig ist, war es nicht möglich, eine größere Anzahl von PTLD-Patienten in die Studie mit aufzunehmen. Um die statistische Aussagekraft zu verbessern, haben wir die Anzahl der Patienten in der Kontrollgruppe erhöht und 408 abgestimmte Empfänger von soliden Organtransplantaten in die Fall-Kontroll-Studie aufgenommen. Um den Einfluss anderer Variablen auf die statistischen Analysen zu minimieren/auszuschließen, wurden den Patienten der Kontrollgruppe diejenigen Patienten aus der PTLD Gruppe gegenübergestellt, bei denen die Art des Organs, das Alter, das Transplantationsalter und die Immunsuppressivtherapie übereinstimmten. Mittels MANOVA konnte bestätigt werden, dass diese Faktoren keine Störvariablen sind und dass die genotypbezogene Assoziation ein unabhängiger Risikofaktor ist. Zudem wurden Patienten der Kontrollgruppe mit gravierenden chronischen Erkrankungen wie alle Arten von chronischen aktiven Infektionen, entzündlichen Erkrankungen, Krebs oder hämatologischen Störungen aus der Studie ausgeschlossen.

Kein Teilnehmer aus der Kontrollgruppe wies Perioden einer EBV-Reaktivierung während der posttransplantativen Nachuntersuchungen auf, verglichen mit einer 100 % EBV Reaktivierung bei den Patienten mit PTLD. Wir konnten keine Assoziation zwischen 308TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 (Codon 10) und +874IFN- $\gamma$  SNPs und PTLD nachweisen.

Die Feststellungen unserer Studie bestätigen daher die vorangegangenen Beobachtungen (Lee et al., 2006) nicht, die auf eine Assoziation zwischen IFN- $\gamma$  Polymorphismen und PTLD bei pädiatrischen Lebertransplantat-Empfängern hinwiesen. Unterschiede können zum Teil auf die Studienpopulation und den geographischen Standort zurückzuführen sein. Die Anzahl der in der vorherigen Studie analysierten PTLD Patienten war kleiner (sechs PTLD-Fälle) als bei der

vorliegenden Studie und es handelte sich ausnahmslos um pädiatrische Lebertransplantat-Empfänger.

Zusammengefasst ist zu sagen, dass die vorliegende Studie die Rolle der genetischen Varianten bei zwei Schlüsselzytokinen des Th2-Wegs als Risikofaktor für die Entwicklung einer PTLD bei Transplantationspatienten unterstützt. Insofern kann die Auswertung entsprechender Einzelnukleotidpolymorphismen von Zytokingenen eine Identifizierung solcher Patienten ermöglichen, bei denen ein Risiko für eine EBV-assoziierte PTLD besteht und eine präemptive Therapie dieser Patienten ermöglichen.

Insgesamt legen unsere Feststellungen nahe, dass eine durch genetische Faktoren beeinflusste Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichts eine wichtige Rolle in der Pathogenese der spät auftretenden, EBV-assoziierten PTLD spielt.

Die gefundenen Assoziationen können zur Etablierung neuer Marker zur Vorhersage eines Lymphomrisikos bei Patienten nach Organtransplantation beitragen. So könnten dann Patienten mit festgestellter Risikokonstellation bereits vor der Transplantation einer speziellen (weniger aggressiven) Immunsuppression unterzogen werden, sowie häufiger als die restliche Population in Bezug auf EBV-Reaktivierung sowie Lymphomentwicklung untersucht werden.

## 6. Zusammenfassung

Die lymphoproliferative Erkrankung post transplantationem (posttransplant lymphoproliferative disease, PTLD) ist eine schwerwiegende Komplikation. Die Mortalität der Erkrankung liegt zwischen 40 und 60 %, wobei die Inzidenz des Transplantatsversagens bis zu 60 % betragen kann.

Eine Reihe von früheren Studien zeigte eine Assoziation zwischen PTLD und EBV-Infektionen. Nach dem Zeitpunkt der Lymphom-Manifestation kann man zwischen einer frühen PTLD (PTLD-Entwicklung innerhalb der ersten 3 Jahre nach Transplantation) und einer späten PTLD (Entstehung der Lymphome bei Patienten mit dem Transplantatalter > 3 Jahre) unterscheiden. Ähnlich wie frühe PTLD haben Patienten mit später PTLD meistens eine erhöhte EBV Viruslast im Blut. Jedoch entwickeln nur einige Patienten mit hoher EBV Viruslast eine PTLD. Die Definition von Risikofaktoren würde das Monitoring erleichtern und evtl. eine preemptive antivirale Therapie gezielter ermöglichen.

Eine wichtige Rolle in der Kontrolle einer EBV-Infektion sowie maligner Erkrankungen nimmt die zelluläre Immunantwort ein. Insbesondere der Balance in der Produktion pro- und anti-inflammatorischer Zytokine durch die Immunzellen scheint den Verlauf dieser Erkrankungen bedeutend zu beeinflussen. Die Stärke der Zytokinexpression wird im Wesentlichen durch genetisch determinierte Polymorphismen in kodierenden und nicht-kodierenden Bereichen der Zytokingene bestimmt. Unter Verwendung von SSP-PCR (Sequence-Specific-Primer-PCR) für die Genotypisierung wurde in der vorliegenden case-control Studie der prädiktive Wert von Einzelnukleotid-Polymorphismen von -1082IL-10, -308TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 (codon 10,25), und +874IFN- $\gamma$ -Genen für die Entstehung von späten EBV-assoziierten Posttransplantations-Lymphomen untersucht.

38 Patienten mit später EBV-assoziiierter PTLD und 408 gematchte Empfänger solider Transplantate als Kontrollgruppe wurden in die Studie inkludiert. Die molekular-genetische Analyse von Einzelnukleotid-Polymorphismen zeigte, dass TGF- $\beta$ 1 (codon 25) CC-Genotyp, das eine niedrige Zytokinproduktion kodiert, signifikant häufiger bei Patienten mit PTLD vorlag als in der Kontrollgruppe (OR=0,34; 95% CI 0.17 to 0.69, P=0,0022). Zusätzlich war die Häufigkeit von -1082 IL-10 GG-Genotyp, das mit einer hohen Zytokinproduktion assoziiert ist, in der Kontrollgruppe höher als bei Patienten mit PTLD (OR=0,5; 95% CI 0.23 to 1.0,

P=0,048). Wir fanden keine Assoziationen zwischen -308TNF-  $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 codon 10 und +874IFN- $\gamma$  Einzelnukleotid-Polymorphismen und PTLD. Des Weiteren bestand kein Zusammenhang zwischen Erkrankungsverlauf bzw. -Ausgang und den untersuchten Zytokinpolymorphismen.

Unsere Daten demonstrieren somit klare Evidenzen für die wichtige Rolle der zwei Th2-Pathway-Schlüsselzytokine als Risikofaktoren für die PTLD-Entwicklung. Dies kann auf einer Seite zum besseren Verständnis der Immunpathogenese der späten EBV assoziierten PTLD beitragen, andererseits bieten Ergebnisse dieser Arbeit eine Grundlage für die Risikostratifizierung transplantierte Patienten sowie der Patienten, die auf einer Transplantationswarteliste stehen.

## 8. Literaturverzeichnis

Armitage, J. M., Kormos, R. L., Stuart, R. S., Fricker, F. J., Griffith, B. P., Nalesnik, M., Hardesty, R. L., and Dummer, J. S. (1991). *J Heart Lung Transplant* 10, 877-86; discussion 886-7.

Awad, M., Pravica, V., Perrey, C., El Gamel, A., Yonan, N., Sinnott, P. J., and Hutchinson, I. V. (1999). *Hum Immunol* 60, 343-6.

Babcock, G. J., Decker, L. L., Freeman, R. B., and Thorley-Lawson, D. A. (1999). *J Exp Med* 190, 567-76.

Babcock, G. J., Decker, L. L., Volk, M., and Thorley-Lawson, D. A. (1998). *Immunity* 9, 395-404.

Bakker, N. A., van Imhoff, G. W., Verschuuren, E. A., van Son, W. J., Homan van der Heide, J. J., Veeger, N. J., Kluin, P. M., and Kluin-Nelemans, H. C. (2005). *Clin Transplant* 19, 327-34.

Baumforth, K. R., Young, L. S., Flavell, K. J., Constandinou, C., and Murray, P. G. (1999). *Mol Pathol* 52, 307-22.

Benjamin, D., Knobloch, T. J., and Dayton, M. A. (1992). *Blood* 80, 1289-98.

Benkerrou, M., Durandy, A., and Fischer, A. (1993). *Hematol Oncol Clin North Am* 7, 467-75.

Beutler, B., Milsark, I. W., and Cerami, A. C. (1985). *Science* 229, 869-71.

Bhatia, S., Ramsay, N. K., Steinbuch, M., Dusenbery, K. E., Shapiro, R. S., Weisdorf, D. J., Robison, L. L., Miller, J. S., and Neglia, J. P. (1996). *Blood* 87, 3633-9.

Bidwell, J., Keen, L., Gallagher, G., Kimberly, R., Huizinga, T., McDermott, M. F., Oksenberg, J., McNicholl, J., Pociot, F., Hardt, C., and D'Alfonso, S. (1999). *Genes Immun* 1, 3-19.

Caillard, S., Dharnidharka, V., Agodoa, L., Bohen, E., and Abbott, K. (2005). *Transplantation* 80, 1233-43.

Cambien, F., Ricard, S., Troesch, A., Mallet, C., Generenaz, L., Evans, A., Arveiler, D., Luc, G., Ruidavets, J. B., and Poirier, O. (1996). *Hypertension* 28, 881-7.

Cao, S., Cox, K., Esquivel, C. O., Berquist, W., Concepcion, W., Ojogho, O., Monge, H., Krams, S., Martinez, O., and So, S. (1998). *Transplantation* 66, 851-6.

Carrozzo, M., Uboldi de Capei, M., Dametto, E., Fasano, M. E., Arduino, P., Broccoletti, R., Vezza, D., Rendine, S., Curtioni, E. S., and Gandolfo, S. (2004). *J Invest Dermatol* 122, 87-94.

Cockfield, S. M., Preiksaitis, J. K., Jewell, L. D., and Parfrey, N. A. (1993). *Transplantation* 56, 88-96.

Cohen, A. H., Sweet, S. C., Mendeloff, E., Mallory, G. B., Jr., Huddleston, C. B., Kraus, M., Kelly, M., Hayashi, R., and DeBaun, M. R. (2000). *Am J Respir Crit Care Med* 161, 1252-5.

Constantin, A., Navaux, F., Lauwers-Cances, V., Abbal, M., van Meerwijk, J. P., Mazieres, B., Cambon-Thomsen, A., and Cantagrel, A. (2001). *Lancet* 358, 2051-2.

Conway, D. J., Holland, M. J., Bailey, R. L., Campbell, A. E., Mahdi, O. S., Jennings, R., Mbeni, E., and Mabey, D. C. (1997). *Infect Immun* 65, 1003-6.

Cunha, F. Q., Moncada, S., and Liew, F. Y. (1992). *Biochem Biophys Res Commun* 182, 1155-9.

Cunningham, L. M., Chapman, C., Dunstan, R., Bell, M. C., and Joske, D. J. (2003). *Leuk Lymphoma* 44, 251-5.

D'Alfonso, S., and Richiardi, P. M. (1996). *Immunogenetics* 44, 321-2.

Dayar, J. M., Beutler, B., and Cerami, A. (1985). *J Exp Med* 162, 2163-8.

de Waal Malefyt, R., Figdor, C. G., Huijbens, R., Mohan-Peterson, S., Bennett, B., Culpepper, J., Dang, W., Zurawski, G., and de Vries, J. E. (1993). *J Immunol* 151, 6370-81.

Demeter, J., Porzolt, F., Ramisch, S., Schmidt, D., Schmid, M., and Messer, G. (1997). *Br J Haematol* 97, 107-12.

Derynck, R., Rhee, L., Chen, E. Y., and Van Tilburg, A. (1987). *Nucleic Acids Res* 15, 3188-9.

Dharnidharka, V. R., Sullivan, E. K., Stablein, D. M., Tejani, A. H., and Harmon, W. E. (2001). *Transplantation* 71, 1065-8.

Ding, L., Linsley, P. S., Huang, L. Y., Germain, R. N., and Shevach, E. M. (1993). *J Immunol* 151, 1224-34.

Doak, P. B., Montgomerie, J. Z., North, J. D., and Smith, F. (1968). *Br Med J* 4, 746-8.

Dockrell, D. H., Strickler, J. G., and Paya, C. V. (1998). *Clin Infect Dis* 26, 180-2.

Dolcetti, R. (2007). *Autoimmun Rev* 7, 96-101.

Emilie, D., Touitou, R., Raphael, M., Peuchmaur, M., Devergne, O., Rea, D., Coumbraras, J., Crevon, M. C., Edelman, L., Joab, I., and et al. (1992). *Eur J Immunol* 22, 2937-42.

Epstein, M. A., Achong, B. G., and Barr, Y. M. (1964). *Lancet* 1, 702-3.

Erllich, H. A., Gelfand, D.H., Saiki, R.K. (1988). *Nature* 331, 461-462.

Ferber, I. A., Brocke, S., Taylor-Edwards, C., Ridgway, W., Dinisco, C., Steinman, L., Dalton, D., and Fathman, C. G. (1996). *J Immunol* 156, 5-7.

Fumeaux, T., and Pugin, J. (2002). *Am J Respir Crit Care Med* 166, 1475-82.

Gamble, J. R., Harlan, J. M., Klebanoff, S. J., and Vadas, M. A. (1985). *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 8667-71.

Gazzinelli, R. T., Oswald, I. P., James, S. L., and Sher, A. (1992). *J Immunol* 148, 1792-6.  
Gelb, B. D. (2006). *N Engl J Med* 355, 841-4.

Ghobrial, I. M., Habermann, T. M., Macon, W. R., Ristow, K. M., Larson, T. S., Walker, R. C., Ansell, S. M., Gores, G. J., Stegall, M. D., and McGregor, C. G. (2005). *Transplantation* 79, 244-7.

Giacomini, D., Paez-Pereda, M., Theodoropoulou, M., Labeur, M., Refojo, D., Gerez, J., Chervin, A., Berner, S., Losa, M., Buchfelder, M., Renner, U., Stalla, G. K., and Arzt, E. (2006). *Endocrinology* 147, 247-56.

Go, N. F., Castle, B. E., Barrett, R., Kastelein, R., Dang, W., Mosmann, T. R., Moore, K. W., and Howard, M. (1990). *J Exp Med* 172, 1625-31.

Gomez-Jimenez, J., Martin, M. C., Sauri, R., Segura, R. M., Esteban, F., Ruiz, J. C., Nuvials, X., Boveda, J. L., Peracaula, R., and Salgado, A. (1995). *J Infect Dis* 171, 472-5.

Grainger, D. J., Heathcote, K., Chiano, M., Snieder, H., Kemp, P. R., Metcalfe, J. C., Carter, N. D., and Spector, T. D. (1999). *Hum Mol Genet* 8, 93-7.

Haan, K. M., Kwok, W. W., Longnecker, R., and Speck, P. (2000). *J Virol* 74, 2451-4.

Haan, K. M., and Longnecker, R. (2000). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9252-7.

Hahn, S. A., Schutte, M., Hoque, A. T., Moskaluk, C. A., da Costa, L. T., Rozenblum, E., Weinstein, C. L., Fischer, A., Yeo, C. J., Hruban, R. H., and Kern, S. E. (1996). *Science* 271, 350-3.

Hanto, D. W. (1995). *Annu Rev Med* 46, 381-94.

Hislop, A. D., Annels, N. E., Gudgeon, N. H., Leese, A. M., and Rickinson, A. B. (2002). *J Exp Med* 195, 893-905.

Ho, A. S., and Moore, K. W. (1994). *Ther Immunol* 1, 173-85.

Howard, M., and O'Garra, A. (1992). *Immunol Today* 13, 198-200.

Itoh, K., and Hirohata, S. (1995). *J Immunol* 154, 4341-50.

Jabs, W. J., Hennig, H., Kittel, M., Pethig, K., Smets, F., Bucsky, P., Kirchner, H., and Wagner, H. J. (2001). *J Clin Microbiol* 39, 564-9.

Janeway, C. A., Travers, P. (1997). *Spectrum*.

Jarrett, R. F. (2003). *Leuk Lymphoma* 44 Suppl 3, S27-32.

Joncas, J., Boucher, J., Granger-Julien, M., and Filion, C. (1974). *Can Med Assoc J* 110, 33-7.

Kawa, K. (2000). *Int J Hematol* 71, 108-17.

Kee, B. L., Rivera, R. R., and Murre, C. (2001). *Nat Immunol* 2, 242-7.

Kieff, E., Rickinson, A.B. (2001). Lippincott Williams and Wilkins., 2511-2627.

Kim, B. J., Min, S. U., Park, K. Y., Choi, J. W., Park, S. W., Youn, S. W., Park, K. C., and Huh, C. H. (2008). *J Dermatolog Treat* 19, 216-20.

Kirchner, G., Krämer, B., and Schlitt, H.-J. (2007). 1. Auflage.

Kroes, A. C., van der Pijl, J. W., van Tol, M. J., van Krieken, J. H., Falk, K. I., Gratama, J. W., and van der Woude, F. J. (1997). *Clin Infect Dis* 24, 339-43.

Kuga, S., Otsuka, T., Niuro, H., Nuno, H., Nemoto, Y., Nakano, T., Ogo, T., Umei, T., and Niho, Y. (1996). *Exp Hematol* 24, 151-7.

Lalani, I., Bhol, K., and Ahmed, A. R. (1997). *Ann Allergy Asthma Immunol* 79, 469-83.

Lan, Q., Zheng, T., Shen, M., Zhang, Y., Wang, S. S., Zahm, S. H., Holford, T. R., Leaderer, B., Boyle, P., and Chanock, S. (2007). *Hum Genet* 121, 161-8.

Lee, T. C., Savoldo, B., Barshes, N. R., Rooney, C. M., Heslop, H. E., Gee, A. P., Caldwell, Y., Scott, J. D., and Goss, J. A. (2006). *Clin Transplant* 20, 389-93.

Li, M. O., Sanjabi, S., and Flavell, R. A. (2006a). *Immunity* 25, 455-71.

Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A. K., and Flavell, R. A. (2006b). *Annu Rev Immunol* 24, 99-146.

Liu, Y., de Waal Malefyt, R., Briere, F., Parham, C., Bridon, J. M., Banchereau, J., Moore, K. W., and Xu, J. (1997). *J Immunol* 158, 604-13.

Liu, Y., Wei, S. H., Ho, A. S., de Waal Malefyt, R., and Moore, K. W. (1994). *J Immunol* 152, 1821-9.

Loeffler, G., Petrides, P. E., and Heinrich, P. C. (2003). Springer 7. Auflage.

Manoury-Schwartz, B., Chiocchia, G., Bessis, N., Abehsira-Amar, O., Batteux, F., Muller, S., Huang, S., Boissier, M. C., and Fournier, C. (1997). *J Immunol* 158, 5501-6.

Marchant, A., Deviere, J., Byl, B., De Groote, D., Vincent, J. L., and Goldman, M. (1994). *Lancet* 343, 707-8.

Massague, J., Blain, S. W., and Lo, R. S. (2000). *Cell* 103, 295-309.

McLaughlin, K., Wajstaub, S., Marotta, P., Adams, P., Grant, D. R., Wall, W. J., Jevnikar, A. M., and Rizkalla, K. S. (2000). *Liver Transpl* 6, 570-4.

Mertz, P. M., DeWitt, D. L., Stetler-Stevenson, W. G., and Wahl, L. M. (1994). *J Biol Chem* 269, 21322-9.

Mira, J. P., Cariou, A., Grall, F., Delclaux, C., Losser, M. R., Heshmati, F., Cheval, C., Monchi, M., Teboul, J. L., Riche, F., Leleu, G., Arbibe, L., Mignon, A., Delpech, M., and Dhainaut, J. F. (1999). *Jama* 282, 561-8.

Miyashita, E. M., Yang, B., Babcock, G. J., and Thorley-Lawson, D. A. (1997). *J Virol* 71, 4882-91.

Mlynarczewska, A., Wysoczanska, B., Karabon, L., Bogunia-Kubik, K., and Lange, A. (2004). *Bone Marrow Transplant* 34, 339-44.

Montone, K. T., Hodinka, R. L., Salhany, K. E., Lavi, E., Rostami, A., and Tomaszewski, J. E. (1996). *Mod Pathol* 9, 621-30.

Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., and O'Garra, A. (2001). *Annu Rev Immunol* 19, 683-765.

Mormann, M., Rieth, H., Hua, T. D., Assouhou, C., Roupelieva, M., Hu, S. L., Kremsner, P. G., Luty, A. J., and Kube, D. (2004). *Genes Immun* 5, 246-55.

Mosmann, T. R., and Coffman, R. L. (1989). *Annu Rev Immunol* 7, 145-73.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-73.

Muti, G., Klersy, C., Baldanti, F., Granata, S., Oreste, P., Pezzetti, L., Gatti, M., Gargantini, L., Caramella, M., Mancini, V., Gerna, G., and Morra, E. (2003). *Br J Haematol* 122, 927-33.

Muzio, M., Polntarutti, N., Bosisio, D., Prahladan, M. K., and Mantovani, A. (2000). *Eur Cytokine Netw* 11, 489-90.

Nalesnik, M. A., Jaffe, R., Starzl, T. E., Demetris, A. J., Porter, K., Burnham, J. A., Makowka, L., Ho, M., and Locker, J. (1988). *Am J Pathol* 133, 173-92.

Nalesnik, M. A., and Starzl, T. E. (1994). *Transplant Sci* 4, 61-79.

Nemerow, G. R., Wolfert, R., McNaughton, M. E., and Cooper, N. R. (1985). *J Virol* 55, 347-51.

Niuro, H., Otsuka, T., Tanabe, T., Hara, S., Kuga, S., Nemoto, Y., Tanaka, Y., Nakashima, H., Kitajima, S., Abe, M., and et al. (1995). *Blood* 85, 3736-45.

Oomizu, S., Chaturvedi, K., and Sarkar, D. K. (2004). *Endocrinology* 145, 1473-80.

Opelz, G., Daniel, V., Naujokat, C., and Dohler, B. (2009). *Transplantation* 88, 962-7.

Opelz, G., and Dohler, B. (2004). *Am J Transplant* 4, 222-30.

Pattle, S. B., and Farrell, P. J. (2006). *Expert Opin Biol Ther* 6, 1193-205.

Pearson, G. R. (1988). *J Virol Methods* 21, 97-104.

Perussia, B. (1991). *Curr Opin Immunol* 3, 49-55.

Purdue, M. P., Lan, Q., Krickler, A., Grulich, A. E., Vajdic, C. M., Turner, J., Whitby, D., Chanock, S., Rothman, N., and Armstrong, B. K. (2007). *Carcinogenesis* 28, 704-12.

Purtilo, D. T. (1987). *South Med J* 80, 943-7.

Quinlan, S. C., Pfeiffer, R. M., Morton, L. M., and Engels, E. A. (2011). *Am J Hematol* 86, 206-9.

R Core Team (2012). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

Rea, D., Fourcade, C., Leblond, V., Rowe, M., Joab, I., Edelman, L., Bitker, M. O., Gandjbakhch, I., Suberbielle, C., Farcet, J. P., and et al. (1994). *Transplantation* 58, 317-24.

Renner, U., Paez-Pereda, M., Arzt, E., and Stalla, G. K. (2004). *Front Horm Res* 32, 96-109.

Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., Peronne, C., Vezzio, N., Hsu, D. H., Kastelein, R., Moore, K. W., and Banchereau, J. (1992). *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1890-3.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). *Science* 239, 487-91.

Sankaran, D., Asderakis, A., Ashraf, S., Roberts, I. S., Short, C. D., Dyer, P. A., Sinnott, P. J., and Hutchinson, I. V. (1999). *Kidney Int* 56, 281-8.

Savard, M., Belanger, C., Tardif, M., Gourde, P., Flamand, L., and Gosselin, J. (2000). *J Virol* 74, 2612-9.

Schlich Thomas: *Transplantation: Geschichte, Medizin, Ethik der Organverpflanzung*. C.H.Beck Verlag, (1998), ISBN 3-406-43300-6

Schroder, K.; Hertzog, P. J.; Ravasi, T. und Hume, D. A. (2004): Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions, *J Leukoc Biol* 75 [2], Seite 163-89.

Shahinian, V. B., Muirhead, N., Jevnikar, A. M., Leckie, S. H., Khakhar, A. K., Luke, P. P., Rizkalla, K. S., Hollomby, D. J., and House, A. A. (2003). *Transplantation* 75, 851-6.

Shapiro, R., Nalesnik, M., McCauley, J., Fedorek, S., Jordan, M. L., Scantlebury, V. P., Jain, A., Vivas, C., Ellis, D., Lombardozzi-Lane, S., Randhawa, P., Johnston, J., Hakala, T. R., Simmons, R. L., Fung, J. J., and Starzl, T. E. (1999). *Transplantation* 68, 1851-4.

Smith, J. M., Rudser, K., Gillen, D., Kestenbaum, B., Seliger, S., Weiss, N., McDonald, R. A., Davis, C. L., and Stehmen-Breen, C. (2006). *Transplantation* 81, 175-80.

Swinnen, L. J. (2000). *Ann Oncol* 11 Suppl 1, 45-8.

Tan, E. L., Selvaratnam, G., Kananathan, R., and Sam, C. K. (2006). *BMC Cancer* 6, 227.

Tanner, J., Weis, J., Fearon, D., Whang, Y., and Kieff, E. (1987). *Cell* 50, 203-13.

Taylor, A. L., Marcus, R., and Bradley, J. A. (2005). *Crit Rev Oncol Hematol* 56, 155-67.

Tierney, R. J., Steven, N., Young, L. S., and Rickinson, A. B. (1994). *J Virol* 68, 7374-85.

Tracey, K. J., Beutler, B., Lowry, S. F., Merryweather, J., Wolpe, S., Milsark, I. W., Hariri, R. J., Fahey, T. J., 3rd, Zentella, A., Albert, J. D., and et al. (1986). *Science* 234, 470-4.

Turner, D., Grant, S. C., Yonan, N., Sheldon, S., Dyer, P. A., Sinnott, P. J., and Hutchinson, I. V. (1997). *Transplantation* 64, 776-9.

Turner, D.M., Williams, D.M., Sankaran D., Lazarus, M., Sinnott, P.J., and Hutchinson, I.V. (1997). An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur. J Immunogenet.* 24, 1-8.

Turner D, Williams DM, Sankaran D, et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogen* 1997; 24: 1.

Vajro, P., Lucariello, S., Migliaro, F., Sokal, E., Gridelli, B., Vegnente, A. et al. (2000). Predictive value of Epstein-Barr virus genome copy number and BZLF1 expression in blood lymphocytes of transplant recipients at risk for lymphoproliferative disease. *J Infect Dis* 181 (6): 2050-2054.

Vajdic, C. M., McDonald, S. P., McCredie, M. R., van Leeuwen, M. T., Stewart, J. H., Law, M., Chapman, J. R., Webster, A. C., Kaldor, J. M., and Grulich, A. E. (2006). *Jama* 296, 2823-31.

Valente, G.; Ozmen, L.; Novelli, F.; Geuna, M.; Palestro, G.; Forni, G. und Garotta, G. (1992): Distribution of interferon-gamma receptor in human tissues, *Eur J Immunol* 22 [9], Seite 2403-12.

van Der Poll, T., Marchant, A., and van Deventer, S. J. (1997). *Clin Microbiol Infect* 3, 605-607.

Vegso, G., Hajdu, M., and Sebestyén, A. (2011). *Pathol Oncol Res* 17, 443-54.

Vermeire, K., Heremans, H., Vandeputte, M., Huang, S., Billiau, A., and Matthys, P. (1997). *J Immunol* 158, 5507-13.

Walker, R. C., Paya, C. V., Marshall, W. F., Strickler, J. G., Wiesner, R. H., Velosa, J. A., Habermann, T. M., Daly, R. C., and McGregor, C. G. (1995). *J Heart Lung Transplant* 14, 214-21.

Westendorp, R. G., Langermans, J. A., Huizinga, T. W., Elouali, A. H., Verweij, C. L., Boomsma, D. I., and Vandenbroucke, J. P. (1997). *Lancet* 349, 170-3.

Young, L. S., and Rickinson, A. B. (2004). *Nat Rev Cancer* 4, 757-68.

Zhang, G. X., Xiao, B. G., Bai, X. F., van der Meide, P. H., Orn, A., and Link, H. (1999). *J Immunol* 162, 3775-81.

## **9. Anhang**

### **9.1 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **9.2. Eidesstattliche Erklärung**

### Erklärung

"Ich, Natalia Schneider, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Einfluss von Zytokingenpolymorphismen auf die Entstehung von EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen post transplantationem, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe."

Datum

Unterschrift

### **9.3 Danksagung**

Ich möchte allen danken, die mich unterstützt haben, damit diese Arbeit gelingt.

Ich danke Ihnen, Frau PD Dr. Nina Babel für Ihren Einsatz, Betreuung und Unterstützung bei der Verwirklichung meiner Arbeit. Dafür, dass Sie mich nicht aufgegeben haben.

Auch allen aus dem Monbijou- Labor für Eure Hilfe und Geduld möchte ich mich bedanken.

Einen herzlichen Dank möchte ich an dieser Stelle meiner Familie aussprechen. Ganz besonders meinen Eltern und meinen Schwiegereltern, ohne die mein Studium nicht möglich gewesen wäre. Ich danke Euch für mein Leben, für Eure Unterstützung und dafür, dass Ihr an mich immer geglaubt habt.