

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele**

**Etablierung einer PCR-Methode zur Chimärismusdiagnostik**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Dhyana Beyerle**

**aus Prien am Chiemsee**

**Würzburg, Oktober 2016**

**Referent:** Prof. Dr. Jürgen Löffler  
**Koreferent:** Prof. Dr. Matthias Eyrich  
**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 04.04.2017

**Die Promovendin ist Ärztin**

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1. Stammzelltransplantation	1
1.1. Einteilung	1
1.2. Ablauf der allogenen Transplantation	2
1.3. Indikation	3
1.4. Komplikationen der Stammzelltransplantation	4
1.5. Nachsorge und Überwachung des Therapieerfolgs	6
2. Chimärismus	7
2.1. Definition	7
2.2. Methoden der Chimärismusdiagnostik	8
2.3. Allele und Chimärismusdiagnostik	10
3. Polymerasekettenreaktion	11
3.1. Standard-PCR	11
3.2. Quantitative PCR	12
3.3. Quantitative Real-time-PCR	12
4. Ziel der Arbeit	13
<b>Material</b>	<b>15</b>
1. Primer und Sonden	15
2. Reagenzien und Enzyme	16
3. Geräte und Verbrauchsmaterial	17
<b>Methoden</b>	<b>17</b>
1. DNA-Extraktion	17
2. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	18
3. Polymerasekettenreaktion	19
4. Agarose-Gelelektrophorese	20
5. Quantitative Real-time-PCR	21
5.1. Allelspezifische qRT-PCR	21
5.2. SRY-spezifische qRT-PCR	22
6. Standardreihen	22
7. Standardisierung mittels Housekeeping-Gen HCK	23
8. Berechnung des Chimärismus	24

<b>Ergebnisse</b>	<b>26</b>
1. Patienten und Proben	26
2. Allele	27
2.1. Auswahl und Häufigkeit der Allele	27
2.2. Sensitivität der Allele	29
3. Standardreihen	29
3.1. Allelspezifische Standardreihen	29
3.2. DNA-Gehalt der Standardreihen	31
4. Einteilung in Gruppen	33
5. Auswertung der Daten des TaqMan	34
6. Vergleich der Daten	34
<b>Diskussion</b>	<b>39</b>
1. Allele	39
2. Standardreihen	42
3. Gruppeneinteilung	43
4. Vergleich der Daten	45
<b>Zusammenfassung</b>	<b>49</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>51</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
bp	base pair
CD	Cluster of Differentiation
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CMV	Cytomegalie-Virus
Ct	cycle threshold
$\Delta$	delta
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds-DNA	double-stranded-deoxyribonucleic acid
e	Eulersche Zahl
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere (Latein: et alli)
F	forward
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
HLA	Human Leukocyte Antigen
H <sub>2</sub> O	Wasser
g	Gramm
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
KMT	Knochenmarkstransplantation
ln	Logarithmus naturalis
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer

OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction
qRT-PCR	quantitative Real-time-PCR
R	reverse
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Real-time-PCR
sec	Sekunde
$\Sigma$	Sigma
STR	Short Tandem Repeats
SZT	Stammzelltransplantation
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TDF	Testis determining factor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
VOD	Vene-Occlusive-Disease
vs.	Versus
x	mal
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar
%	Prozent

## **Einleitung**

### **1. Stammzelltransplantation**

Bei Leukämien, Lymphomen und anderen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems steht als Behandlungsmöglichkeit heutzutage eine Übertragung von myeloetischen Stammzellen zur Verfügung. Nach erfolgter Auslöschung des eigenen kranken Knochenmarks, ermöglicht die Stammzelltransplantation (SZT) eine Neubildung der Hämatopoese<sup>[1]</sup>. Damit gibt es eine potentiell kurative Therapieoption von unterschiedlichen bösartigen und gutartigen Erkrankungen des blutbildenden Systems<sup>[2]</sup>.

1959 erfolgte die erste Knochenmarkstransplantation (KMT), die von Sir Donnall Thomas und Mitarbeitern in Seattle durchgeführt wurde. In Deutschland kam es 1975 zur ersten Behandlung durch eine Knochenmarkstransplantation<sup>[1]</sup>.

Mittlerweile wurden mehr als eine Million Behandlungen weltweit durchgeführt<sup>[2]</sup>.

#### **1.1 Einteilung**

Die Stammzelltransplantation kann, je nach Herkunft der Zellen und Aufbereitung des Transplantats, unterteilt werden.

Zum einen unterscheidet man die autologe von der allogenen Transplantation, bei der dem Patienten nach einer Chemotherapie oder Bestrahlung, entweder zuvor gewonnene eigene Stammzellen (autolog) oder solche von einem passenden Spender (allogen), infundiert werden, um „die Hämatopoese des Empfängers aus diesen transplantierten Zellen regenerieren zu lassen.“<sup>[1]</sup>

Weiterhin erfolgt eine Einteilung nach der Herkunft der Zellen: Möglich sind Stammzellen aus dem Knochenmark, peripheren Blut oder der Nabelschnur. Um Stammzellen aus dem peripheren Blut gewinnen zu können, ist es notwendig, den Spender mit G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) vorzubehandeln, einem hämatopoetischen Wachstumsfaktor, um die Mobilisation der Stammzellen aus dem Knochenmark anzuregen<sup>[3]</sup>. Diese Methode wird zunehmend häufiger angewandt, da

zum einen die Narkose zur Knochenmarksentnahme umgangen werden kann und sich zum anderen gezeigt hat, dass die Blutbildung schneller wieder einsetzt<sup>[4]</sup>.

Zudem gibt es eine Unterteilung nach der Aufbereitung des Transplantats in unmanipulierte Stammzellpräparate und „aufgereinigte“ Fraktionen<sup>[1]</sup>, bei denen für die allogene SZT eine T- und B-Zell-Depletion stattfindet<sup>[5]</sup>.

## 1.2 Ablauf der allogenen Transplantation

Um die Voraussetzungen für eine allogene SZT zu schaffen, ist es wichtig einen passenden Spender auszuwählen. Hierbei wird eine möglichst große Übereinstimmung der HLA-Kompatibilität (Human Leukocyte Antigen) gefordert. Außerdem werden zusätzliche Kriterien wie Cytomegalie-Virus-Seroprävalenz, Geschlecht oder Blutgruppenkompatibilität in der Auswahl berücksichtigt. Wünschenswert ist ein HLA-identischer Spender<sup>[6, 7]</sup>; in Ausnahmefällen kann aber auch ein HLA-haploidentischer Spender in Frage kommen, bei dem nicht alle notwendigen HLA-Loci mit denen des Empfängers übereinstimmen oder Spenden aus Nabelschnurblut mit einer größtmöglichen Übereinstimmung<sup>[8, 9]</sup>.

Galt bis vor wenigen Jahren eine Altersgrenze von 60 Jahren für eine allogene Transplantation, führt man heutzutage durchaus auch bei älteren Patienten diese Form der Stammzelltransplantation durch, wenn es der klinische Zustand zulässt<sup>[10]</sup> und eine dosisreduzierte Konditionierungstherapie erwogen wird<sup>[11, 12]</sup>.

Die Stammzellübertragung läuft in drei aufeinander folgenden Phasen ab: Konditionierung, Transplantation und Aplasie.

Man beginnt mit einer Konditionierungstherapie, die drei Hauptziele verfolgt: Eine Myeloablation, die Platz für die Ansiedlung der Spenderzellen schafft, die Immunsuppression, um eine Transplantatabstoßung zu verhindern und die Eradikation der malignen Zellen, also des Tumors oder der Leukämie. Dabei kommen verschiedene Chemotherapeutika, oft ergänzt durch eine Bestrahlung des Knochenmarks, zum Einsatz<sup>[13]</sup>.

War es bis in die 1990er Jahre Ziel, das befallene Knochenmark weitestgehend durch die Konditionierungstherapie zu zerstören und so wenig Spender-T-Zellen wie möglich zu transplantieren, um das Risiko einer GvHD (Graft-versus-Host-Disease) zu



minimieren, hat sich in den letzten Jahren immer deutlicher gezeigt, dass eine komplette Eradikation des Knochenmarks nicht zwingend notwendig ist<sup>[14]</sup>. Man nutzt hierbei den Effekt des „Graft-versus-leukaemia“ durch Spender-Lymphozyten aus<sup>[15]</sup>, die als immunkompetente Zellen die entarteten Tumorzellen des Patienten erkennen und bekämpfen. Dadurch wird die Therapie auch Patienten zugänglich, die vorher aufgrund ihres Alters oder Gesundheitszustandes nicht in Frage kamen<sup>[16]</sup>.

Die Transplantation selbst findet über einen zentralen Venenzugang statt, über den die Stammzellen infundiert werden. Über die Blutbahn gelangen die Zellen ins Knochenmark, wo sie sich ansiedeln und zu differenzieren beginnen<sup>[1]</sup>. Bei peripherer SZT kann man nach ca. 12-14 Tagen, bei KMT nach 14-180 Tagen einen Anstieg von Granulozyten, Retikulozyten und Thrombozyten erwarten<sup>[14]</sup>.

Parallel zur Stammzellübertragung wird mit einer immunsuppressiven Therapie begonnen; beispielsweise mit Ciclosporin, FK-506 oder Mycophenolatmofetil in Kombination mit Prednisolon<sup>[17]</sup>, um eine Abstoßung weitestgehend zu verhindern. Andere Therapieschemata beinhalten den Einsatz von Antithymozytenglobulin während der Konditionierungsphase<sup>[18]</sup>.

Es schließt sich die Phase der Aplasie an, in der die „alte“ Hämatopoese durch die Konditionierung zerstört ist und sich die „neue“ erst einstellen muss. Durch den Mangel an immunkompetenten Zellen zu diesem Zeitpunkt, stellen Infektionen ein ernst zu nehmendes Risiko dar und machen eine intensivmedizinische Betreuung in speziell ausgestatteten Zentren notwendig<sup>[1]</sup>.

### 1.3 Indikationen

Eine allogene Stammzelltransplantation kommt für Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsbildern als Behandlungsmöglichkeit in Frage. Sie steht als Therapiemöglichkeit schweren erblichen und erworbenen hämatologischen Krankheitsbildern<sup>[19]</sup> zur Verfügung, aber vor allem auch den malignen hämatologischen Erkrankungen<sup>[2]</sup>. Sowohl akute und chronische Leukämieformen<sup>[20]</sup> bei Kindern und Erwachsenen, myelodysplastische Syndrome<sup>[21]</sup>, als auch Non-Hodgkin-Lymphome<sup>[22]</sup> sind einer Therapie zugänglich. Ebenso nicht-maligne hämatologische Erkrankungen wie die schwere aplastische Anämie oder die Thalassämie können

hiermit behandelt werden. Je nach Erkrankung stellt man die Indikation zur Therapie früher oder später im Krankheitsverlauf. Bei der akuten myeloischen Leukämie kommt sie sogar primär im Stadium der ersten Komplettremission zur Anwendung<sup>[14]</sup>.

Trotz des mittlerweile großen Einsatzgebiets der Stammzelltransplantation, muss immer individuell entschieden werden, ob der Patient die Voraussetzungen erfüllt, solch eine Behandlung zu überstehen. Der Aussicht auf Heilung steht eine Reihe an schwerwiegenden Komplikationen gegenüber, denen nicht immer durch Prophylaxemaßnahmen entgegengewirkt werden kann.

#### 1.4 Komplikationen der SZT

So wie die Transplantation in Etappen abläuft, gibt es zu jedem Schritt auch typische Komplikationen, die frühzeitig erkannt werden müssen, um gravierende Nebenwirkungen größtenteils einzudämmen.

Während der Vorbehandlung, also der Phase der Konditionierungstherapie, kann es zu Schädigungen an Organen wie Leber, Niere, Herz oder Lunge kommen, bedingt durch Chemotherapie, Bestrahlung und Immunsuppression<sup>[14]</sup>.

Den von Patienten oft am unangenehmsten empfundenen Folgen wie Übelkeit, Erbrechen<sup>[23]</sup>, Mukositis<sup>[24]</sup> und Haarausfall, stehen massive Beeinträchtigungen der Organsysteme gegenüber, wie z.B. Nierenversagen unter Ciclosporintherapie<sup>[25]</sup> oder ein Verschluss der kleinen Lebervenen, als Vene-Occlusive-Disease (VOD) bezeichnet, der mit einer prokoagulatorischen Entzündungsreaktion und Nekrose der Leberzellen einhergeht<sup>[26]</sup>.

Die nach der Konditionierung folgende Phase der Aplasie birgt das Risiko von Infektionen. Fieber, als Leitsymptom, kann zwar auch im Rahmen der Transplantatorganisation und einer Graft-versus-Host-Reaktion auftreten, sollte aber immer durch die eingehende Suche nach Bakterien, Viren und Pilzen abgeklärt werden. In der Neutropenie ist daher auch eine prophylaktische Gabe von Antibiotika, Virustatika und Antimykotika zu überdenken<sup>[27, 28]</sup>.

Reaktivierung von Viruserkrankungen (z.B. Cytomegalievirus) oder spenderassoziierte Neuinfektionen mit Viren können im Verlauf schwerwiegende, sogar lebensbedrohliche Ausmaße annehmen<sup>[29]</sup>.

Bei Auftreten von Fieber in der frühen Phase nach Stammzelltransplantation sollte zudem an ein Engraftment-Syndrom gedacht werden, häufig mit einem exanthematischen Hautausschlag und einer pulmonalen Symptomatik einhergehend. Dieses Krankheitsbild kann leicht mit einer GvHD verwechselt werden<sup>[30]</sup>.

Ausschließlich bei der allogenen Stammzellübertragung tritt die GvHD als Komplikation auf. Eine Reaktion, bei der sich die T-Zellen des Spenders gegen Zellen des Patienten richten, da sie die andersartigen Histokompatibilitätsantigene auf den Zelloberflächen der Patientenzellen als fremd erkennen<sup>[31]</sup>. Bis zu 30 % der Empfänger entwickeln eine GvHD<sup>[32]</sup>. Man unterteilt die Graft-versus-Host-Disease in eine akute und eine chronische Reaktion und gliedert sie in unterschiedliche Schweregrade<sup>[31]</sup>.

Akut heißt, dass die Immunreaktion innerhalb der ersten 100 Tage nach Transplantation auftritt. Sie äußert sich durch Exantheme an Haut und Schleimhäuten, Durchfall und Hepatitis<sup>[14]</sup>, bedingt durch eine massive Zytokinfreisetzung<sup>[33, 34]</sup>. Zur Vorbeugung werden Immunsuppressiva gegeben, die eine derartige Reaktion der Spenderlymphozyten unterdrücken sollen. Auch Antikörper gegen Bestandteile der T-Zellen kommen zum Einsatz<sup>[14]</sup>. In der Primärtherapie wird die immunsuppressive Therapie gesteigert und Methylprednisolon eingesetzt<sup>[35]</sup>. Neuere Therapiestrategien setzen Cyclophosphamid in der frühen Phase der Transplantation zur Vermeidung der GvHD ein<sup>[36, 37]</sup>.

Die chronische Graft-versus-Host-Reaktion kann entweder mit oder ohne vorausgegangener akuter Erkrankung auftreten<sup>[31]</sup>. Sie entwickelt sich per definitionem später als 100 Tage nach der Transplantation<sup>[38]</sup> und manifestiert sich vor allem an folgenden Organsystemen: Haut, Schleimhäuten, Gastrointestinaltrakt, Leber, Atemwegen, Nervensystem, sowie am muskuloskeletalen System und bei Frauen an der Vagina. Sicca-Symptomatik, Atrophie der Schleimhäute, Vaskulitis und Bronchiolitis obliterans sind nur einige der vielfältigen Möglichkeiten der unerwünschten Wirkung der Spenderzellen auf den Patientenorganismus<sup>[39]</sup>. Ziel ist hier zunächst die Vermeidung der akuten Form der GvHD bzw. ihre adäquate Behandlung, da somit auch die chronische GvHD seltener auftritt. Weiterhin werden therapeutisch ähnliche Medikamente wie bei der akuten Form gegeben. Der Chimärismusstatus des Patienten scheint auf das Auftreten der GvHD durchaus einen Einfluss zu haben<sup>[40, 41]</sup>.

Anders als bei der Graft-versus-Host-Disease, findet bei der Transplantatabstoßung eine immunologische Reaktion gegen Spenderzellen durch das Immunsystem des Empfängers statt. Beteiligt sind hierbei vor allem die T-Zellen, natürlichen Killerzellen und die vom Empfänger gebildeten Antikörper gegen die hämatopoetischen Spenderzellen<sup>[42]</sup>. Geschieht dies zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach der Transplantation, verlängert sich die Aplasiephase und das Transplantat wächst nicht an. Bei der sekundären Abstoßung hat bereits eine Neubildung von hämatopoetischen Zellen begonnen, der ein Absinken der Leukozytenzahl folgt<sup>[1]</sup>.

Bei Verdacht sollte umgehend eine Chimärismusbestimmung durchgeführt werden, um den Anteil von T-Zellen des Empfängers zu bestimmen. Sind sie erhöht, so sollte schnellstmöglich eine intensiviert Immunsuppression eingeleitet werden, gegebenenfalls eine Retransplantation<sup>[14]</sup>.

### 1.5 Nachsorge und Überwachung des Therapieerfolgs

Nachdem die neuen Stammzellen angewachsen sind, ist es notwendig den Patienten über längere Zeit ambulant zu betreuen, da sich das Immunsystem langsam regeneriert und erst wieder im Verlauf seine volle Funktion übernimmt. Im Zentrum der Nachsorge stehen dabei verschiedene Gefahren, die es frühzeitig zu erkennen und zu behandeln gilt: Zum einen systemische Infektionen, die schnell einen fulminanten Hergang nehmen können<sup>[1]</sup>, zum anderen das Auftreten einer GvHD oder ein Rezidiv der Grunderkrankung<sup>[43]</sup>.

Es werden deshalb in kurzen Abständen molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt, die Aufschluss über die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs geben. Man untersucht einerseits den Status der minimalen Resterkrankung, also den Anteil an noch verbliebenen Tumorzellen<sup>[44]</sup>. Dieser sollte im Lauf der Zeit abnehmen, da ansonsten ein erhöhtes Risiko für ein Rezidiv der Grunderkrankung besteht<sup>[45, 46]</sup>.

Andererseits wird eine Chimärismusanalyse durchgeführt, um den Anteil von Spender- zu Empfängerzellen zu bestimmen<sup>[1]</sup>.

Eine erfolgreiche Transplantation zeigt sich am Chimärismus, welcher nach Absetzen der Immunsuppression stabil bleibt<sup>[14]</sup>. Steigt dieser an, so ist schnell zu reagieren. Sowohl im Rahmen einer Abstoßungsreaktion, als auch bei einem Rezidiv treten

Patientenzellen vermehrt auf und es bedarf einer Therapie<sup>[47, 48]</sup>. Als Option steht hier eine Transfusion von Spender-Lymphozyten zur Verfügung, die der Chemotherapie überlegen ist<sup>[49]</sup>. Man macht sich dabei den „Graft-versus-Leukemia“-Effekt zu Nutze<sup>[50]</sup>. Auch die Gabe von dendritischen Donorzellen ist eine Therapiemöglichkeit<sup>[41, 51]</sup>.

Je früher das Eingreifen durch eine geeignete Therapiemaßnahme stattfindet, umso wahrscheinlicher ist ein rezidivfreies Überleben für den Patienten, da sowohl ein hoher Anteil der minimalen Resterkrankung, als auch des gemischten Chimärismus mit einem größeren Risiko eines Therapieversagens einhergehen<sup>[52]</sup>.

## 2. Chimärismus

### 2.1 Definition

In der griechischen Mythologie ist die Chimäre ein feuerschnaubendes Ungeheuer, welches aus verschiedenen Anteilen zusammengesetzt ist – als Vorderteil ein Löwe, in der Mitte eine Ziege und als Hinterteil ein Drache. In der Botanik und auch der Medizin beschreibt es ein Individuum, das genetisch unterschiedliche Anteile besitzt<sup>[53]</sup>.

Beim Chimärismus durch allogene Stammzelltransplantation bildet sich nach Bestrahlung und damit einhergehender Zerstörung des eigenen Immunsystems, ein Chimärismus zwischen eigenen Körperzellen und gespendeten Stammzellen im Empfänger aus<sup>[54]</sup>.

Es entwickelt sich eine Toleranz gegenüber Spenderzellen und -gewebe, die durch die Transplantation von immungenetisch unterschiedlichen Stammzellen entsteht<sup>[14]</sup>.

Gleichzeitig kann sich im Rahmen eines gemischten Chimärismus eine Toleranz der Spenderzellen gegenüber den Empfängerzellen entwickeln, die möglicherweise für ein schnelleres Rezidiv der Erkrankung ursächlich ist<sup>[55]</sup>.

## 2.2 Methoden der Chimärismusdiagnostik

Wie im Kapitel 1.5 erwähnt, ist die Chimärismusdiagnostik ein fester Bestandteil der Therapieüberwachung nach allogener Stammzellübertragung. In bestimmten zeitlichen Abständen wird eine Blut- oder Knochenmarksprobe des Patienten auf das Auftauchen von patienteneigenen hämatopoetischen Zellen untersucht<sup>[56]</sup>, die eigentlich durch die Konditionierungstherapie und den „Graft-versus-Leukemia“-Effekt nicht mehr vorhanden sein sollten.

Es sind in den letzten Jahren verschiedene Verfahren zur Chimärismusbestimmung entwickelt worden, die alle mit Vorteilen und Nachteilen behaftet sind.

So gibt es die Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) bei einer gemischt-geschlechtlichen Empfänger-Spender-Konstellation<sup>[57]</sup>, die Amplifikation von short tandem repeats (STR) mittels PCR<sup>[58]</sup> und die in dieser Arbeit relevante Methode der quantitativen Real-time-PCR mittels TaqMan<sup>[59]</sup>, die entweder auf der Erkennung sogenannter Insertions-Deletions-Polymorphismen wie bei Alizadeh et al. beruht<sup>[59]</sup> oder Einzelnukleotid-Polymorphismen erfasst<sup>[60, 61]</sup>. Bei gemischt-geschlechtlicher Empfänger-Spender-Konstellation mit einem männlichen Empfänger und einem weiblichen Spender besteht zudem die Möglichkeit, eine quantitative Real-time-PCR mit Hilfe des SRY-Gens durchzuführen<sup>[62]</sup>.

Zu den neuesten Methoden gehört die Droplet Digital PCR, die absolute Mengen des DNA-Gehaltes angeben kann und verspricht, schneller und präziser als die qRT-PCR zu sein<sup>[63, 64]</sup>.

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung werden Chromosomen mittels einer Sonde detektiert, die sich an die Zielsequenz anlagert. Ein Fluorochrom-gekoppelter Antikörper, der wiederum an die Sonde bindet, bringt die Chromosomen im Fluoreszenzmikroskop zum Leuchten<sup>[65]</sup>. Der Nachteil dieser Methode liegt in der äußerst begrenzten Anwendbarkeit, da nur bei geschlechtlich differentem Empfänger und Spender die Möglichkeit der Detektion vorhanden ist<sup>[66]</sup>.

Eines der momentan geläufigsten Verfahren stellt die Chimärismusbestimmung mittels short tandem repeats dar<sup>[67, 68]</sup>. Short tandem repeats sind DNA-Sequenzen, die aus sich wiederholenden Basenpaarsequenzen von zwei bis sechs Basenpaaren zusammengesetzt sind. Da mittlerweile tausende von ihnen im gesamten Genom identifiziert sowie

kartiert sind<sup>[69]</sup> und sie sich interindividuell stark unterscheiden, können sie sehr gut zur Identitätsbestimmung herangezogen werden. Mittels einer fluoreszenzbasierten PCR kann so schnell und sicher bei nahezu allen Patienten ein Chimärismus untersucht werden. Die Treffsicherheit und Anwendbarkeit bei fast 100% der allogenen Transplantationen hat diese Methode zum Goldstandard etabliert. Allerdings ist die Sensitivität eingeschränkt, da die Erkennung von Empfängerzellen nur zwischen 1 und 5 pro 100 Zellen liegt<sup>[70]</sup>.

Eine wesentlich höhere Sensitivität, nämlich bis 0,1%, verspricht die allelspezifische, quantitative Real-time-PCR, die sich der TaqMan-Technologie bedient. Sequenzspezifische hybridisierende Sonden, die sich zwischen forward- und reverse-Primer an die DNA anlagern und durch die Taq-Polymerase freigelegt werden, geben dabei ein Fluoreszenzsignal frei, das von einem Thermocycler analysiert werden kann. Äquivalent zur ansteigenden DNA-Menge während der Exponentialphase, steigt das Signal der freigelegten Sonden an und wird zu dem Zeitpunkt detektiert, an dem ein signifikanter Anstieg zu messen ist. Dieser wird als cycle threshold ( $C_t$ ) bezeichnet<sup>[59]</sup>. Basis dieser Form der Chimärismusbestimmung ist eine Untersuchung von Empfänger und Spender auf Anwesenheit von ausgewählten Zielsequenzen auf bestimmten Allelen<sup>[71]</sup>. Eine Heterozygotie zwischen Spender und Empfänger ist nötig.

Diese Voraussetzung ist auch bei der quantitativen RT-PCR erfüllt, die sich das SRY-Gen zu Nutzen macht.

SRY steht für „Sex determining region of Y-Gen“ und kodiert den TDF (Testis determining factor), einen Transkriptionsfaktor, der in der Entwicklung des Geschlechts beim Menschen eine entscheidende Rolle spielt<sup>[72]</sup>. Da es nur auf dem Y-Chromosom liegt, kann es somit in der Diagnostik für geschlechtsdifferente Konstellationen genutzt werden<sup>[73]</sup>. Im Vergleich zur FISH, deren Anwendbarkeit auf die gleiche Population zutrifft, verspricht die quantitative Real-time-PCR mit Hilfe des SRY-Gens eine größere Sensitivität<sup>[60]</sup>.

Die digitale PCR wird zum Auszählen einzelner Nukleinsäuremoleküle verwendet. Dabei wird die Probe auf tausende Einzelreaktionen, sog. Partitionen verteilt, sodass jede Einzelreaktion nur eine sehr geringe Anzahl an DNA- oder RNA-Molekülen des gesuchten Zielgens enthält. Bei der Droplet Digital PCR erfolgt die Verteilung der Probe in sehr viele einzelne Tröpfchen (droplets). Im Gegensatz zur Real-time-PCR

wird der DNA-Gehalt in einer Probe durch das Auszählen von positiven und negativen Reaktionen am Ende der Amplifizierung bestimmt. Eine Standardkurve zur Quantifizierung des DNA-Gehalts ist nicht notwendig.

Durch die Partitionierung der Probe wird die Quantifizierung deutlich weniger durch Störfaktoren, wie biologische oder durch die Probenvorbereitung eingebrachte Inhibitoren beeinflusst.

Aufgrund dieser Eigenschaften eignet sich die Droplet Digital PCR für die Chimärismusbestimmung, weil bereits kleine Mengen DNA erkannt werden und durch vereinfachte Arbeitsschritte quantifiziert werden können<sup>[63, 74]</sup>.

### 2.3 Allele und Chimärismusdiagnostik

Der Begriff Allel entstammt dem Griechischen und kann übersetzt werden mit „gegenseitig, zueinander gehörig“<sup>[54]</sup>. Allele sind die Varianten eines Genortes<sup>[75]</sup> bzw. die unterschiedlichen Ausprägungen eines Gens, „die auf homologen Chromosomen am gleichen Locus(Gen) lokalisiert sind“<sup>[54]</sup>. Durch sie wird die Vielfalt unserer genetischen Möglichkeiten ausgezeichnet<sup>[75]</sup>.

Da der Mensch über einen diploiden Chromosomensatz verfügt, kann er entweder die gleichen Allele besitzen, er ist dann homozygot, oder verschiedene, dann ist er heterozygot für eine Eigenschaft<sup>[76]</sup>.

Anhand dieser Eigenschaften können Allele herangezogen werden, um zwischen Individuen genetisch unterscheiden zu können. In bestimmten Bevölkerungsgruppen sind manche Allele häufiger vertreten und andere weniger. So kann man sie auch in der Molekulardiagnostik nutzen, um ein konstantes Unterscheidungskriterium zwischen zwei Menschen zu haben.

2002 haben Alizadeh et al.<sup>[59]</sup> in ihrer Arbeit 19 Genorte gefunden, zugeordnet zu elf Allelen, die zur Chimärismusdiagnostik verwendet werden können. Auswahlkriterien waren eine große Heterozygotie in der Bevölkerung und das Vorhandensein von biallelischen Polymorphismen, die sich mindestens in zwei Basen unterschieden. Anhand dieser Merkmale konnten sie bei mehr als 90% der Empfänger-Spender-Paare den Ursprung der Zellen feststellen.



### 3. Polymerasekettenreaktion

#### 3.1 Standard-PCR

1983 wurde die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaktion; PCR) von Kary B. Mullis eher zufällig bei einer nächtlichen Autofahrt erfunden. Das Prinzip zur Amplifikation von kleinsten Mengen an Nukleinsäuren wurde schnell von Medizin, Biotechnologie, Forensik oder auch der Paleobiologie genutzt und revolutionierte dort die Methodik zum Nachweis von DNA<sup>[77]</sup>.

Der außerordentliche Vorteil der PCR liegt in der Möglichkeit, im Gegensatz zu anderen Verfahren, mit theoretisch nur einem einzigen Nukleinsäureabschnitt innerhalb von Stunden bis zu  $10^{12}$  identischer Kopien herzustellen, die dann anderen analytischen Methoden zur Verfügung stehen<sup>[78]</sup>.

Die Polymerasekettenreaktion läuft in drei sich wiederholenden Phasen ab: Denaturierung, Annealing und Elongation. Im Denaturierungsschritt wird die zu vervielfältigende DNA bei  $94^{\circ}\text{C}$  in ihre zwei gegenläufigen Stränge gespalten. Anschließend wird die Probe auf  $55^{\circ}\text{C}$  gekühlt, um die Primer oder Oligonucleotide, die dem Ansatz zugefügt wurden, an die DNA-Einzelstränge binden zu lassen – das Annealing. In der letzten Phase, durchgeführt bei  $72^{\circ}\text{C}$ , synthetisiert die Taq-Polymerase, ausgehend von dem Primer, den komplementären Strang. Das Ausgangsmolekül wird damit verdoppelt<sup>[65]</sup>.

Durch Wiederholung dieser Reihenfolge erreicht man eine exponentielle Amplifikation des Ursprungsmoleküls. In der Regel werden 30-35 Zyklen durchgeführt, um eine ausreichende Menge an Produkt zu generieren.

Im Anschluss können die PCR-Produkte beispielsweise mit Hilfe einer Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht werden.

Die Suche nach interindividuellen Unterschieden, beispielsweise das Vorhandensein oder Fehlen einer Zielsequenz auf einem bestimmten Allel, ist damit möglich und erlaubt somit z.B. im Rahmen der Chimärismusdiagnostik, Spender- und Empfänger-DNA eindeutig zuzuordnen<sup>[78]</sup>.

### 3.2 Quantitative PCR

Sowohl in der Infektiologie, z.B. bei Hepatitis C, als auch in der Onkologie, z.B. bei Stammzelltransplantation, ist die Quantifizierung von Nukleinsäuren zur Diagnostik und Therapieüberwachung nicht mehr wegzudenken. Problematisch hierbei ist, dass es sich bei der PCR um eine exponentielle Vervielfältigung handelt, anstatt um eine lineare. Daher können minimale Änderungen in der Wirkkraft der Reaktion zu einer maximalen Veränderung der Produktmenge führen. Weiterhin schließt sich an die exponentielle Phase ein Plateau an, was durch die zunehmende Hemmung der PCR, z.B. durch Komponentenverbrauch, bedingt ist. Die Effizienz ändert sich somit und es entsteht ein Sättigungswert, der bei maximal  $10^{13}$  Molekülen liegt. Durch diese Faktoren wird bei der quantitativen PCR, bei der nicht nur das Produkt an sich, sondern vielmehr die Ursprungsmenge von Interesse ist, die Ergebnisfindung erschwert und benötigt zusätzliche Maßnahmen, um eine Quantifizierung vornehmen zu können. Hierzu eignet sich beispielsweise eine externe Eichkurve, die durch Amplifikation von Proben bekannter Konzentration erstellt wird, die eine ähnliche Zielsequenz besitzen wie das zu untersuchende Präparat. Eine andere Möglichkeit ist die interne Standardisierung mittels so genannter Housekeeping-Gene. Diese Gene sollten in allen Zellen und Geweben möglichst konstant sein und jederzeit exprimiert werden. Da das Signal dieser Gene bei der Amplifikation demnach beständig bleibt, kann das Ergebnis dieses Ansatzes mit dem der Zielsequenz verglichen und somit die Menge indirekt berechnet werden<sup>[78]</sup>.

### 3.3 Quantitative Real-time-PCR

Eine der modernsten Methoden zu Quantifizierung von Nukleinsäuren bietet die Real-time-PCR, bei der in einem einzigen Lauf sowohl Amplifikation als auch Detektion des PCR-Produktes möglich sind<sup>[65]</sup>. Ein Vorteil hierbei ist die Vermeidung von Kontaminationen, da beides in einem geschlossenen System in Echtzeit abläuft und somit unterbrechende Arbeitsschritte vermieden werden.

Zur Detektion werden dem Ansatz Sonden zugefügt, die sich während der Amplifikation an die Zielsequenz anlagern, z.B. ein Abschnitt auf einem bestimmten

Allel, und entweder über die Spaltung durch die Taq-Polymerase (TaqMan-Sonden) oder durch das Annealing selbst (LightCycler) ein messbares Signal bewirken<sup>[78]</sup>. Diese Signale entstehen aufgrund des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET). Vereinfacht wird hier die Energie eines angeregten Farbstoffs (Fluorochrom), als Donor oder reporter bezeichnet, auf einen zweiten Farbstoff übertragen, genannt Akzeptor oder quencher.

Beim TaqMan-Prinzip sitzen reporter und quencher auf dem gleichen Oligonukleotid oder der Sonde. Ist das Oligonucleotid intakt, sendet es nur eine geringe Lichtstärke aus, wird jedoch der reporter auf der Sonde durch Abbau durch die Taq-Polymerase freigesetzt, steigt die Lichtstärke an. Äquivalent zum Anstieg der DNA-Menge während der Amplifikation werden auch reporter an den Sonden freigesetzt, folglich steigt die Stärke des Signals an<sup>[79]</sup>.

Anders als bei einer normalen Quantifizierungs-PCR, wird bei der Real-time-PCR nicht die absolute Produktmenge gemessen, sondern man macht sich die Kinetik der PCR zu Nutze: Auf die exponentielle Phase folgt eine lineare Phase, die im Plateau mündet (s. Kapitel 3.2 der Einleitung). Die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade noch vom Hintergrund abhebt, kurz vor dem Erreichen des Plateaus, wird als Ct-Wert bezeichnet und stellt den Richtwert dar. Um den Ct-Wert der Template-DNA quantifizieren zu können, bietet es sich an, eine Eichkurve mit bekannten Konzentrationen und ihren zugehörigen Ct-Werten anzulegen. Der Proben-Ct-Wert kann dann in die Eichkurve eingeordnet werden. Damit ist es möglich, Rückschlüsse auf die Konzentration der Probe zu ziehen<sup>[65]</sup>.

Mit dem TaqMan-Verfahren können also Hybridisierungs sonden eingesetzt werden, die spezifisch für ein bestimmtes Allel und den dazu passenden Primer generiert werden.

Der große Vorteil der Real-time-PCR im Vergleich mit der konventionellen PCR liegt also mitunter darin, dass man weder eine genau bestimmte Menge an Proben-DNA einsetzen muss, noch im Anschluss weitere Verfahren zur Auswertung der PCR notwendig sind<sup>[80]</sup>.

#### 4. Ziel der Arbeit

Die Chimärismusbestimmung ist wesentlicher Bestandteil der Überwachung des Therapieergebnisses nach allogener Stammzelltransplantation<sup>[81, 82]</sup>. Wenn andere

spezifische Marker versagen, kann mittels der Chimärismusdiagnostik ein drohendes Rezidiv der Grunderkrankung frühzeitig erkannt werden<sup>[83]</sup>. Auch das Risiko, eine Graft-versus-Host-Disease oder eine Abstoßung zu entwickeln, kann hiermit abgeschätzt werden<sup>[84-86]</sup>.

Als Goldstandard gilt bisher die Methode der short-tandem-repeat-PCR, die sehr sicher ist und bei den meisten Empfänger-Spender-Paaren angewandt werden kann<sup>[59, 61, 87]</sup>. Die Sensitivität lässt jedoch zu wünschen übrig, da im besten Fall eine unter 100 Zellen erkannt wird<sup>[44, 88, 89]</sup>. Gerade im Bereich des fast kompletten Chimärismusstatus erreicht die short-tandem-repeat-PCR ihre Grenzen<sup>[62]</sup>. Da aber besonders die frühestmögliche Detektion einer Veränderung im Chimärismus zwischen Patient- und Spenderzellen wichtig ist, um einem Rezidiv vorbeugen zu können, liegt es nahe, nach Methoden zu suchen, die sensitiver als die short-tandem-repeat-PCR sind. Alizadeh et al.<sup>[59]</sup> ist dies mit der Entwicklung einer quantitativen Real-time-PCR gelungen, die auf allelspezifischen Polymorphismen beruht. Hiermit soll es gelingen, eine unter 1000 Zellen zu entdecken und somit bereits zu einem Zeitpunkt Maßnahmen zu ergreifen, der der klinischen Manifestation weit vorausgeht.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Chimärismusanalyse mit einer hochempfindlichen und genauen Methode im eigenen Institut für molekulare Hämatologie der Universität Würzburg anbieten zu können und damit einen schnellen Zugang zu den Ergebnissen für die anfordernden klinischen Abteilungen zu schaffen.

Es wurden die gleichen Genloci verwendet wie bei Alizadeh et al.<sup>[59]</sup>, allerdings wurde die Kalibrierung der verwendeten Patientenproben zusätzlich anhand einer Standardisierung durch ein sog. Housekeeping-Gen vorgenommen, das in möglichst vielen Zellen eines Organismus vorkommt und konstant exprimiert wird<sup>[90]</sup>.

Dieses Verfahren wurde mittels retrospektiv untersuchter Patientenproben evaluiert, die mit extern ermittelten Daten der short-tandem-repeat-PCR verglichen wurden.

## **Material**

### **1. Primer und Sonden**

Primer

S01a F	GGTACCGGGTCTCCACATGA
S01a R*	GGGAAAGTCACTCACCCAAGG
S01b F	GTACCGGGTCTCCACCAGG
S02 F	GCTTCTCTGGTTGGAGTCACG
S02 R	GCTTGCTGGCGGACCCT
S03 F	CTTTTGCTTTCTGTTTCTTAAGGGC
S03 R	TCAATCTTTGGGCAGGTTGAA
S04a F*	CTGGTGCCACAGTTACGCT
S04a R	AAGGATGCGTGACTGCTATGG
S04b R	AGGATGCGTGACTGCTCCTC
S05a F	AAAGTAGACACGGCCAGACTTAGG
S05a R*	CATCCCCACATACGGAAAAGA
S05b F	AGTTAAAGTAGACACGGCCTCCC
S06 F	CAGTCACCCCGTGAAGTCCT
S06 R	TTTCCCCCATCTGCCTATTG
S07a F	TGGTATTGGCTTTAAAATACTGGG
S07a R	TGTACCCAAAACACTCAGCTGCA
S07b F	GGTATTGGCTTTAAAATACTCAACC
S07b R	CAGCTGCAACAGTTATCAACGTT
S08a F	CTGGATGCCTCACTGATCCA
S08a R*	TGGGAAGGATGCATATGATCTG
S08b F	GCTGGATGCCTCACTGATGTT
S09a F*	GGGCACCCGTGTGAGTTTT
S09a R	TCAGCTTGTCTGCTTTCTGGAA
S09b R	CAGCTTGTCTGCTTTCTGCTG
S10a F	GCCACAAGAGACTCAG
S10a R	TGGCTTCCTTGAGGTGGAAT
S10b F	TTAGAGCCACAAGAGACAACCAG

S11a F	TAGGATTCAACCCTGGAAGC
S11a R*	CCAGCATGCACCTGACTAACA
S11b F	CCCTGGATCGCCGTGAA

#### Sonden

S01	CTGGGCCAGAATCTTGGTCCTCACA
S02	CTGCACCACCAAATCATCCCCGTG
S03	CATAGCTGCACAGGGTCCCCGAGT
S04	TCCTGGCAGTGTGGTCCCTTCAGAA
S05	CCCTGGACACTGAAAACAGGCAATCCT
S06	CCCATCCATCTTCCCTACCAGACCAGG
S07	TCCTCACTTCTCCACCCCTAGTTAAACAG
S08	CTCCCAACCCCCATTTCTGCCTG
S09	TGGAGGATTTCTCCCCTGCTTCAGACAG
S10	CAGTGTCCCCTCAAGTACTCCTTTGGA
S11	CAAGGCTTCCTCAATTCTCCACCCTTCC

## 2. Reagenzien und Enzyme

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Agarose	Roth
DNA-Ladder (100 bp)	Invitrogen
dNTP-Mix	Fermentas
Ethanol (Absolut)	SigmaAldrich
Ethidiumbromid	FLUKA
Gel Ladepuffer (blue juice)	Invitrogen
PegLab Kit	PegLab
QIAamp® DNA Blood Mini Kit	QIAGEN
TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems
Taq Polymerase	Fermentas
Wasser steril	Roth

10x TAE – Puffer

Invitrogen

### 3. Geräte und Verbrauchsmaterial

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
ABI PRISM 7300	Applied Biosystems
Alphamager	ProteinSimple
Centrifuge 5415D und 5415R	Eppendorf
DNA-Gelelektrophoresekammer	Biometra
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -80°C	Heraeus
Magnetrührer Monotherm	Variomag/Thermo
Mastercycler ep	Eppendorf
Mikrowelle MM 41568	Micromaxx
Photometer Nanodrop ND 1000	PeqLab
Pipetten	Eppendorf
Tisch-Schüttler (MS1 Minishaker)	IKA-Works, Inc.
Wasserbad Memmert WB7	Memmert
Vortex Genie 2	Scientific Industries
96 well Platten	SigmaAldrich

## Methoden

### 1. DNA-Extraktion

Zur Analyse der patientenspezifischen Allele, sowie zur Quantifizierung des Chimärismus im Patientenblut mittels der RT-PCR musste zunächst DNA aus Vollblut extrahiert werden.

Dafür wurde das QIAamp® DNA Blood Mini Kit verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur unter einer Flow Hood durchgeführt.

Zu Beginn wurden 20 µl QIAGEN Protease in ein 1,5 ml fassendes Mikroreaktionsgefäß pipettiert und 200 µl Probenmaterial dazu gegeben. Dann kamen

200 µl AL-Puffer hinzu und das Mikroreaktionsgefäß wurde für 15 sec. gevortext und im Anschluss kurz anzentrifugiert. Es folgte eine zehnmütige Inkubation der Probe bei 56°C im Wasserbad. Danach wurde die Probe noch einmal leicht anzentrifugiert, bevor 200 µl 96%iger Ethanol dazu pipettiert wurden. Die Probe wurde wieder 15 sec. gevortext und kurz anzentrifugiert.

Das komplette Volumen des Mikroreaktionsgefäßes wurde jetzt auf ein spezielles vorgestecktes Säulchen pipettiert (QIAamp Mini spin Säulen) und bei 8000 rpm (rounds per minute) für 1 min. bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Säulchen wurde auf ein neues 2 ml fassendes Mikroreaktionsgefäß gesteckt und das Filtrat verworfen. Dann wurden 500 µl AW1-Waschpuffer zugegeben und erneut bei 8000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Wieder wurde das Säulchen auf ein neues 2 ml fassendes Mikroreaktionsgefäß umgesteckt und das Filtrat verworfen. Nach Zugabe von 500 µl AW2-Waschpuffer, wurde das Säulchen bei 14000 rpm 3 min. zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und das Säulchen nochmals für eine Minute bei 14000 rpm trocken zentrifugiert.

Nun wurde das Säulchen auf ein 1,5 ml fassendes Mikroreaktionsgefäß umgesteckt und 200 µl AE-Puffer auf die Filter der Säulchen pipettiert. Nach einer Minute Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Säulchen bei 8000 rpm für 1 min. zentrifugiert und anschließend das Eluat photometrisch bestimmt, um den DNA-Gehalt und die Reinheit festzustellen.

Die Proben wurden im Kühlschrank bei -20°C bis zum Gebrauch eingefroren.

## 2. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Um den DNA-Gehalt der Proben zu bestimmen wurde eine photometrische Messung der optischen Dichte mittels Absorptionsspektrometrie durchgeführt. Die Messung wurde bei einer optischen Dichte (OD) von 260 nm durchgeführt, da hier die Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum haben. Die Konzentration errechnet sich dann durch die gemessene optische Dichte, der Verdünnung und einem spezifischen Multiplikationsfaktor, bei ds-DNA Faktor 50. Außerdem können Aussagen über die Reinheit der Probe gemacht werden, indem das Verhältnis der zu messenden Probe bei OD 260 nm und OD 280 nm berechnet wird<sup>[65]</sup>.



Die Vermessung der Gesamt-DNA erfolgte im NanoDrop Spectrophotometer. Nach der DNA-Isolation wurde 1 µl der Probe vermessen. Als Referenzwert diente das Lösungsmittel, das bei der DNA-Extraktion verwendet wurde. Die oben beschriebene Umrechnung der Probe erfolgte automatisch durch das Spektrometer. Für DNA war ein Reinheitsquotient von 1,8 erwünscht.

Für die Standardreihen war eine Konzentration von 100 ng/µl nötig.

### 3. Polymerasekettenreaktion

Um Spender- und Empfänger-DNA nach der Transplantation eindeutig voneinander abgrenzen zu können, musste vorher in einem Standard-PCR-Verfahren ein Allel detektiert werden, in dem sich beide unterscheiden. Aus einer Gruppe von 19 verschiedenen Sequenzpolymorphismen mit elf biallelischen Vorkommen<sup>[59]</sup>, wurden die Spender- und Empfängerproben so lange getestet, bis ein Unterschied zwischen beiden gefunden wurde. Im Idealfall konnten zwei verschiedene Sequenzen zur Unterscheidung entdeckt werden. Festgelegt war, dass der Empfänger hierfür positiv, der Spender negativ getestet werden musste.

Begonnen wurde mit den Polymorphismen, die bei Alizadeh et al.<sup>[59]</sup> am häufigsten eine heterogene Verteilung in der Bevölkerung aufwiesen. Bei geschlechtsdifferenter Spender-Empfänger-Kombination wurde SRY verwendet.

Für die PCR wurde das PegLab-Kit verwendet und der Mastermix entsprechend Herstellerangaben wie unten beschrieben zusammengestellt. Eine Negativprobe wurde immer mitgeführt. Die PCR lief nach folgenden Laufbedingungen ab:

95°C	4 min.	
95°C	30 sec.	45 Zyklen
55°C	30 sec.	
72°C	30 sec	
72°C	5 min.	

#### Master-Mix:

Puffer	5 µl
H <sub>2</sub> O	37,75 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl
dNTP's (10 mM)	1 µl
Primer F (10 µM)	1 µl
Primer R (10 µM)	1 µl
Taq Polymerase	0,25 µl
DNA	2 µl

#### 4. Agarose-Gelelektrophorese

Um die Unterschiede in den Allelen von Patient und Spender sichtbar zu machen, mussten die DNA-Produkte der Standard-PCR auf ein geeignetes Medium gebracht und einer Elektrophorese unterzogen werden.

Als Medium wurde hierzu ein Agarosegel gegossen. Agarose, ein Polysaccharid, löst sich beim Aufkochen, um danach zu einem großporigen Gel zu erstarren. Durch das erzeugte elektrische Feld bei der Elektrophorese wandert die negativ geladene DNA, je nach Größe, schneller oder langsamer zur Anode. Zur Detektion der DNA wird Ethidiumbromid zugefügt, das mit den Basen der Nucleinsäuren interkaliert und im UV-Licht fluoresziert<sup>[91]</sup>.

Es wurde 1 g Agarose in 50 ml TAE(Tris-Acetat-EDTA)-Puffer in der Mikrowelle gelöst und mit 1,5 µl Ethidiumbromid versetzt. Das Gel wurde daraufhin in eine geeignete Kammer gegossen und mit einem Kamm bestückt. Nach Festwerden des Agarosegels wurde die Kammer mit TAE-Puffer aufgefüllt.

Für die Elektrophorese wurde das Gel an den äußeren beiden Taschen mit jeweils 10 µl einer 100 Basenpaar-Leiter (ladder) bestückt, in die restlichen Kammern wurden die DNA-Lösungen eingefüllt. Hierzu wurden jeweils 10 µl PCR-Produkt mit je 10 µl Ladepuffer (loading buffer) auf einem Parafilm vermischt und anschließend in die Kammern pipettiert. Durch den Ladepuffer erhöht sich die Dichte der DNA, was das Einfüllen in die Taschen erleichtert<sup>[65]</sup>. Es wurde immer eine Negativprobe der PCR mitgeführt, um Verunreinigungen auszuschließen.

Die Kammer wurde für 15 min an 130 V angeschlossen.

Im Anschluss wurde das Gel sofort unter UV-Licht im Alphamager ausgewertet.

## 5. Quantitative Real-time-PCR

Nachdem in der Standard-PCR der Sequenzpolymorphismus bestimmt wurde, welcher bei Patient und Spender als Unterscheidungskriterium herangezogen werden sollte, wurden retrospektiv extrahierte DNA-Proben der Patienten in ihrem Verlauf nach Transplantation mit dem TaqMan-Prinzip untersucht. Dies geschah auf einem ABI Prism 7300 (Applied Biosystems). Es wurden allelspezifische Sonden und Primer (biomers.net) verwendet bzw. bei geschlechtsdifferenten Empfänger-Spender-Paaren SRY herangezogen. Zur Kalibrierung der Probe wurden eine externe Eichkurve aus Standardreihen festgelegter Konzentrationen, passend zum Allel, genutzt, sowie die interne Standardisierung mittels des Housekeeping-Gens HCK.

### 5.1 Allelspezifische qRT-PCR

Für die allelspezifische patientenorientierte quantitative Real-time-PCR wurde nachfolgender Master Mix verwendet. Es wurden immer Probentriplets pipettiert, um mögliche Verfälschungen der Ct-Werte durch Kontamination oder Fehler im Ablauf weitestgehend auszuschließen. Eine Negativkontrolle wurde mitgeführt. Die Laufbedingungen waren wie folgt:

50°C	2 min.	
95°C	10 min.	45 Zyklen
95°C	15 sec.	
55°C	30 sec.	
72°C	30 sec.	

### Master-Mix:

TaqMan Universal PCR Master Mix	12,5 µl
H <sub>2</sub> O	4,5 µl
Primer F (10 µM)	1 µl
Primer R (10 µM)	1 µl
Sonde (5 µM)	1 µl
DNA	5 µl

## 5.2 SRY-spezifische qRT-PCR

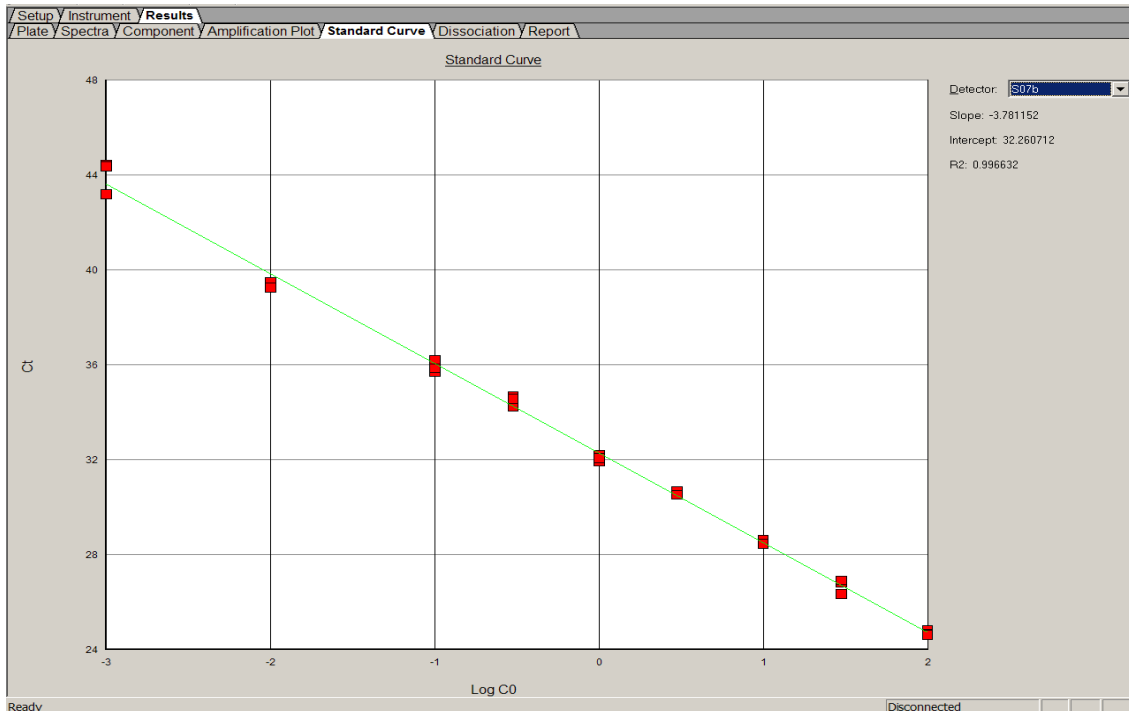
Bei einem Viertel der Patienten gab es ein geschlechtsdifferentes Empfänger-Spender-Paar mit einem männlichen Empfänger und weiblichen Spender<sup>[62]</sup>. Damit bestand bei dieser Gegebenheit die Möglichkeit, den Schritt der Standard-PCR zu überspringen und anhand des SRY-Genes die quantitative Real-time-PCR durchzuführen.

Die Laufbedingungen und die Zusammensetzung des Master Mix waren identisch zu denen der allelspezifischen PCR (s.o.) mit Einsatz von SRY-Primern und –Sonde.

## 6. Standardreihen

Um eine externe Standardisierung der Real-time-PCR zu haben, wurden zu den Sequenzpolymorphismen passende Standardreihen angefertigt, die ein bestimmtes Verhältnis von positivem zu negativem Anteil der gesuchten Sequenz beinhalten. Aus den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe wurde mithilfe der konventionellen PCR für jedes Allel jemand identifiziert, der dieses besaß und jemand, der es nicht besaß. Die extrahierte DNA wurde auf eine Konzentration von 100 ng/µl gebracht und eine Verdünnungsreihe mit 10%, 3,33%, 1%, 0,33%, 0,1% und 0,01% der Ausgangskonzentration hergestellt.

Die Verdünnungsreihen liefen in der quantitativen Real-time-PCR als Triplets und konnten als Eichkurve genutzt werden. Ziel war es, die Kalibrierung an einer annähernd idealen Kurve vornehmen zu können.



**Abbildung 1:** Annähernd ideale allelspezifische Standardkurve mit  $r = 0,997$ .

Der Master Mix wurde nach unten stehendem Schema pipettiert. Die Laufbedingungen waren die gleichen wie bei der qRT-PCR mit Patientenproben.

TaqMan Universal PCR Master Mix	12,5 µl
H <sub>2</sub> O	8 µl
Primer F (10 µM)	1 µl
Primer R (10 µM)	1 µl
Sonde (5 µM)	1 µl
DNA	1,5 µl

## 7. Standardisierung mittels Housekeeping-Gen HCK

Um den DNA-Gehalt der qRT-PCR zu kalibrieren, werden sog. Housekeeping-Gene verwendet. Damit können quantitative und qualitative Unterschiede im PCR-Ergebnis normalisiert werden. Diese Gene sollten in einer Spezies immer in möglichst vielen verschiedenen Zelltypen vorhanden sein, konstant exprimiert und dabei unabhängig

reguliert werden. Außerdem sollten sie ähnlich dem zu untersuchenden Zielgen reguliert werden<sup>[90]</sup>.

Das hier verwendete HCK ist eine hämatopoetische Zellkinase aus der Familie der Tyrosinkinase und auf Chromosom 20q11-q12 lokalisiert (gene id 3055)<sup>[92]</sup>.

Für die quantitative RT-PCR wurde HCK in nachfolgender Master-Mix-Zusammensetzung verwendet. Wie oben erwähnt, wurden auch hier Triplets pipettiert. Eine Negativkontrolle wurde mitgeführt. Sowohl die Patientenproben, als auch die Standardreihen wurden mit HCK kalibriert. Die PCR-Bedingungen entsprachen denen der allelspezifischen RT-PCR.

#### Master-Mix:

Taq-Polymerase	12,5 µl
H <sub>2</sub> O	8,5 µl
Primer F (10 µM)	1 µl
Primer R (10 µM)	1 µl
Sonde (5 µM)	1 µl
DNA	1 µl

### 8. Berechnung des Chimärismus

Die Berechnung des Chimärismus bestand aus mehreren Rechenschritten.

Zunächst wurden die Ct-Werte der Triplets der HCK-Standardreihen von denen der allelspezifischen Standardreihen subtrahiert und der arithmetische Mittelwert nach unten stehender Formel gebildet<sup>[93]</sup>.

$$\bar{x}_{\text{arithm}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

Wobei  $\bar{x} = \Delta Ct$ ,  $x_1 = Ct_{\text{Standard1}} - Ct_{\text{HCK1}}$ ,  $x_2 = Ct_{\text{Standard2}} - Ct_{\text{HCK2}}$ ,  $x_3 = Ct_{\text{Standard3}} - Ct_{\text{HCK3}}$  und  $n=3$ .

Hat man nun die  $\Delta C_t$ -Werte für die einzelnen Konzentrationsstufen errechnet, setzt sich daraus eine Standardkurve mit einer logarithmischen Trendlinie zusammen, anhand derer sich folgende Gleichung erschließt:

$$f(x) = a \cdot \ln(x) + b$$

Wobei a und b Konstanten sind und ln der natürliche Logarithmus.

Löst man die Gleichung nun nach x auf, erhält man die Gleichung, die zur Berechnung des Chimärismus nötig ist.

$$\text{Chimärismus} = 100 - e^{\frac{\Delta C_t - b}{a}}$$

Wobei  $\Delta C_t$  hier aus den Patientenproben nach dem gleichen Prinzip wie bei den Standardproben berechnet wird.

## Ergebnisse

### 1. Patienten und Proben

Im Rahmen der Etablierung der TaqMan-PCR wurden insgesamt 395 Blutproben von 80 Patienten des Uniklinikums Würzburg retrospektiv bestimmt. 127 Proben konnten mit extern ermittelten Chimärismuswerten der Agendix GmbH Dresden, die durch eine STR-PCR bestimmt wurden, verglichen werden. Für die restlichen bestimmten Proben lagen keine externen Vergleichswerte vor. Es wurden hierbei die Daten von 26 Patienten ausgewertet, davon 16 männliche und zehn weibliche Patienten. Pro Patient wurden mehrere Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transplantation ausgewählt. Es wurde dabei darauf geachtet, Proben zu möglichst verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation auszuwählen, ein festes Schema lag jedoch nicht vor. Der Altersdurchschnitt der Patienten lag bei 50,16 Jahren, mit einer Altersspanne von 23 Jahren bis 75 Jahren.

Darunter befanden sich elf Patienten mit einer AML, fünf mit einem multiplen Myelom, vier mit einer ALL, jeweils zwei Patienten mit Osteomyelofibrose und Mantel-Zell-Lymphom, sowie ein Patient mit einer CLL und ein Patient mit einem diffus großzelligen B-Non-Hodgkin-Lymphom.

Ein Patient mit einer Abstoßung musste komplett aus der Datenauswertung genommen werden (elf Proben), da die Proben weder im zeitlichen Verlauf, noch mit den extern ermittelten Daten vergleichbare Werte lieferten.

Weiterhin ausgeschlossen wurden drei Proben, bei denen nach wiederholter Testung eine Detektion am TaqMan nicht möglich war, sowie vier Proben, deren Ct-Wert des Housekeeping-Gens später detektiert wurde, als der Ct-Wert der allelspezifischen PCR. Dadurch war eine Auswertung mittels Chimärismusberechnung nicht möglich, da es zu negativen Chimärismuswerten kam.

Nach Ausschluss der insgesamt 18 Proben blieben noch 109 Proben zum Datenvergleich übrig.



## 2. Allele

### 2.1 Auswahl und Häufigkeit der Allele

Zur Bestimmung der Proben wurde im Rahmen der Arbeit die von Alizadeh et al.<sup>[59]</sup> entwickelte allelspezifische Real-time-PCR verwendet und am Abi Prism 7300 durchgeführt. Zuvor war jedoch eine Testung der vor Transplantation entnommenen Patienten- und Spenderproben auf eine Differenz in den verwendeten Zielsequenzen anhand einer Standard-PCR notwendig.

Hierbei wurden 15 Genorte auf elf Allelen genutzt. Vier weitere der von Alizadeh et al.<sup>[59]</sup> beschriebenen Polymorphismen wurden nicht angewandt. Nicht verwendet wurden die Genloci 01b, 05a, 08a und 09a. Der Ausschluss dieser Genorte begründete sich zum einen auf die geringe Häufigkeit der Polymorphismen 05a und 09a in der Population - dies hatten Alizadeh et al. bereits in ihrer Arbeit gezeigt<sup>[59]</sup>. Zusätzlich wurde dies dadurch bestätigt, dass keine positiv getesteten Personen für die Entwicklung der Standardreihen aus der Arbeitsgruppe gefunden werden konnten. Zum anderen hatten frühere Bestimmungen der Arbeitsgruppe bezüglich dieser Zielsequenzen unbefriedigende Ergebnisse beim Ablauf der RT-PCR gezeigt, so dass auf eine weitere Auswertung verzichtet wurde.

Ziel der Bestimmungen war es, bei jedem Patient zwei Genorte als Unterscheidungskriterium zu finden, um im Falle einer Veränderung des Chimärismus im Rahmen der Nachsorge eine zusätzliche Kontrollmöglichkeit der Werte auf Richtigkeit zu haben. Mit der Standard-PCR wurde hier zunächst auf die häufigsten Genloci getestet, vgl. Alizadeh et al.<sup>[59]</sup>, gefolgt von einer Testung der bis dahin nicht angewandten Polymorphismen bis zur Detektion mindestens eines differenten Allels.

<b>Genort</b>	<b>Vorkommen bei Patienten (n=26)</b>	<b>Angewandt auf Proben (n=116)</b>
01a	9 x (34,62%)	5 x (4,31%)
SRY	8 x (30,77%)	1 x (0,86%)
03	10 x (38,46%)	6 x (5,17%)
04a	14 x (53,85%)	21 x (18,10%)
04b	8 x (30,77%)	Nicht angewandt
05b	7x (26,92%)	3 x (2,59%)
06	5 x (19,23%)	7 x (6,03%)
07a	15 x (57,69%)	10 x (8,62%)
07b	20 x (76,92%)	25 x (21,55%)
08b	10 x (38,46%)	7 x (6,03%)
09b	1 x (3,84%)	Nicht angewandt
10a	3 x (11,54%)	16 x (13,79%)
10b	1 x (3,84%)	7 x (6,03%)
11a	6 x (23,08%)	8 x (6,90%)
11b	3 x (11,54%)	Nicht angewandt

**Tabelle 1:** Vorkommen der verwendeten Genloci bei den untersuchten Patienten, sowie Anwendung der Genloci im Verlauf im Rahmen der TaqMan-Analyse. Dabei wurden manche Patientenproben mit mehreren unterschiedlichen Genloci getestet.

Die Tabelle zeigt die Häufigkeit der Zielsequenzen bei den untersuchten Patientenproben. Die Genorte 07a, 07b und 04a wurden in mehr als der Hälfte der Patientenproben detektiert und kamen dementsprechend häufig in der RT-PCR zum Einsatz.

Von den insgesamt 80 bestimmten Patientenproben war es bei 51,25% der Patienten möglich, eine Sequenz zu finden, die sich vom Spender unterscheidet. Hierbei wurde auch die Möglichkeit der Unterscheidung zwischen Empfänger und Spender mittels SRY bei unterschiedlichem Geschlecht genutzt (10% der Proben). Bei 23,75% konnten bereits zwei und bei 12,5% sogar drei und mehr Genloci gefunden werden, in denen der Empfänger vom Spender differierte. Keine Abweichung in einem der möglichen Genorte war bei 12,5% der Patienten anzutreffen. Somit konnten diese Patienten auch nicht der Analyse mittels TaqMan zugeführt werden.

Im Durchschnitt konnten pro Patient 1,44 Genorte gefunden werden.

## 2.2 Sensitivität der Allele

Im Verlauf zeigte sich, dass bestimmte Allele sensitiver waren als andere. Die meisten der verwendeten Zielsequenzen ergaben reproduzierbar eine Detektion am TaqMan bis zu Konzentrationsstufen von 0,01% vor dem 40. Zyklus. Im Gegensatz dazu konnten die Genorte 03, 04b, 05b, und 11a in den Standardreihen nur bis zu einer Verdünnung von 0,1% nachgewiesen werden, 10b sogar nur bis 0,33%.

## 3. Standardreihen

### 3.1 Allelspezifische Standardreihen

Um für die Probenbestimmung eine externe Standardisierung vornehmen zu können, wurden Standardreihen mit absteigenden Konzentrationsstufen entwickelt. Die hierzu benötigte DNA wurde aus Blutproben der Mitarbeiter der Arbeitsgruppe, sowie benachbarten Arbeitsgruppen gewonnen.

Die angewandten Genorte konnten somit über zehn verschiedene Standardreihen abgedeckt werden.

Mit vier Standardreihen war es möglich, neun der am häufigsten genutzten Polymorphismen zu verwenden (Reihe A – D), mit den Reihen A und B konnten sogar die drei häufigsten Genorte 04a, 07a und 07b bestimmt werden.

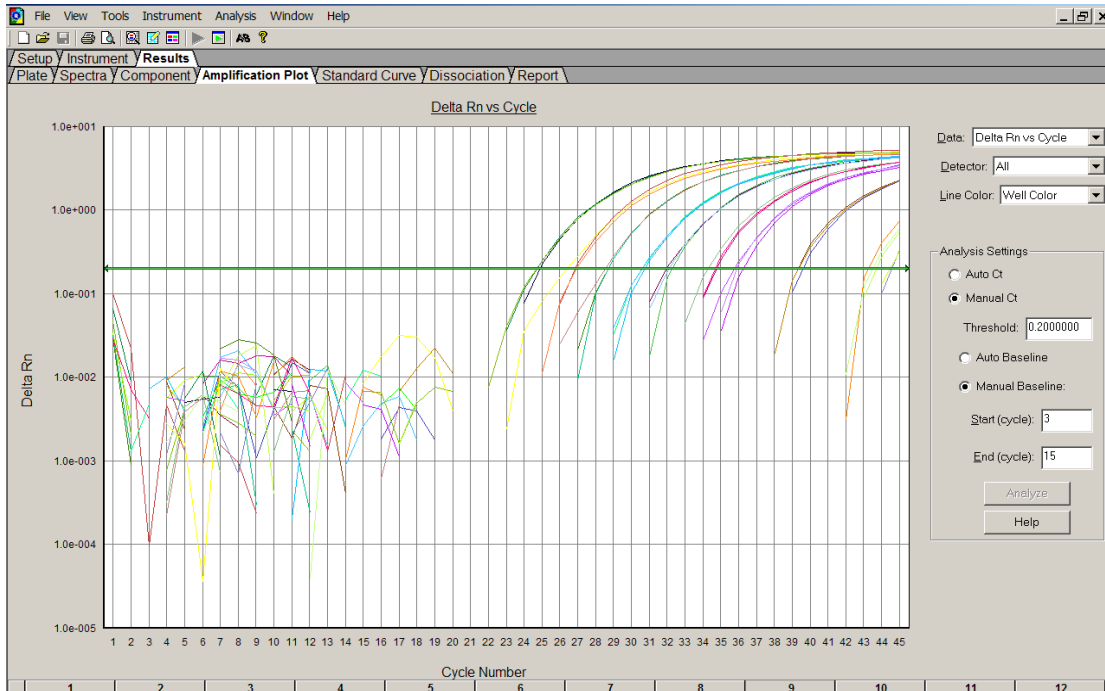
<b>Standardreihe</b>	<b>Genorte</b>
Reihe A	S03, S07b
Reihe B	S04a, S07a, S10a
Reihe C	S10b, S11a
Reihe D	S04b, S01a
Reihe E	S05b
Reihe F	S08b
Reihe G	S06
Reihe H	S11b
Reihe I	SRY (S02)
Reihe J	S09b

**Tabelle 2:** Angefertigte Standardreihen aus DNA der Arbeitsgruppenmitglieder und die damit bestimmbaren Genorte in der RT-PCR. Durch die Reihen A-D können neun der am häufigsten genutzten Genorte abgedeckt werden.

Bevor die Standardreihen in die Chimärismusbestimmung einbezogen wurden, wurde jede einzelne Reihe in mehreren Läufen auf Intraassay- sowie Interassayreproduzierbarkeit getestet. Erst wenn beides bestätigt war, wurden die Standardreihen zusammen mit Patientenproben getestet.

Als tolerierbare Abweichung der Ct-Werte galt ein halber PCR-Zyklus zwischen den einzelnen Werten der Triplets pro Konzentrationsstufe.

In der Abbildung zeigt sich die Intraassayreproduzierbarkeit, hier anhand der Standardreihe A, getestet am Genort 07b. Die Amplifikationskurven der Triplets liegen fast aufeinander, erst in den höheren Verdünnungen entstehen Abweichungen in den Kurven.

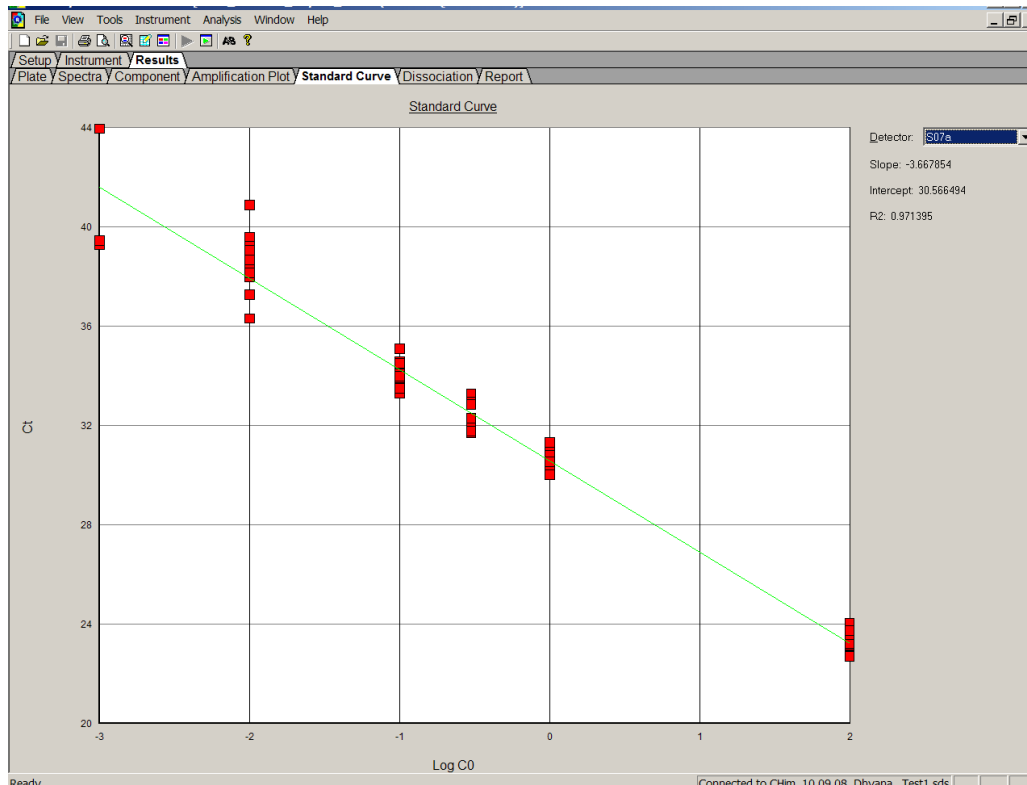


**Abbildung 2:** Kontrolle der Intraassayreproduzierbarkeit, hier anhand des Genortes 07b. In den höheren Konzentrationsstufen decken sich die Kurven fast komplett, erst bei den niedrigeren Konzentrationsstufen zeigen sich Abweichungen der Kurvenverläufe.

### 3.2 DNA-Gehalt der Standardreihen

Zu Beginn der Etablierung der RT-PCR war für die Auswertung am TaqMan ein Volumen von 5  $\mu\text{l}$  DNA pro Mikroreaktionsgefäß bei den mitgeführten allelspezifischen Standardreihen vorgesehen. Da pro Konzentrationsstufe jeweils zwei Triplets geführt wurden, ein allelspezifisches und eines für die Bestimmung für HCK, ergab sich pro Konzentrationsstufe eine verbrauchte Menge von 18  $\mu\text{l}$  der Standardreihe. Um Material und Arbeitszeit einzusparen, wurde getestet, ob die PCR auch mit geringerem DNA-Gehalt bei gleichen Laufbedingungen ähnliche Resultate ergab.

Verglichen wurde hierbei ein Volumen von 5  $\mu\text{l}$ , 3  $\mu\text{l}$ , 2,5  $\mu\text{l}$  und 1,5  $\mu\text{l}$  pro Konzentrationsstufe, ausgehend von 100 ng/ $\mu\text{l}$  DNA bei 100% Empfänger- zu Spenderanteil. Das fehlende Volumen im Master-Mix wurde mit äquivalenter Volumenzugabe von  $\text{H}_2\text{O}$  ausgeglichen.



**Abbildung 3:** Standardkurve der verglichenen Konzentrationen mit unterschiedlichem DNA-Gehalt. Erst ab Konzentrationsstufen  $< 0,3\%$  zeigt sich eine breitere Streuung der Werte um die Gerade. Im Idealfall sollte  $r = 1,00$  betragen. Hier zeigt sich ein  $r$  von  $0,97$ .

In der Auswertung ergab sich, dass die Abweichung der Ct-Werte der Triplets trotz des unterschiedlichen DNA-Gehaltes im Durchschnitt nicht mehr als eine Log-Stufe variierte bis zu einer Konzentration von  $0,3\%$ . Erst in höheren Verdünnungen kam es zu einer größeren Differenz der Werte, die aber in ähnlichem Ausmaß bei der ursprünglichen Konzentration von  $500 \text{ ng DNA}$  bei den geringeren Konzentrationsstufen zu sehen war.

Die Abstände der Ct-Werte einer Verdünnungsreihe zueinander blieben aber bei allen eingesetzten DNA-Mengen weitestgehend konstant, so dass man sich zur Fortführung der PCR mit nur noch  $150 \text{ ng DNA}$  pro Mikroreaktionsgefäß entschied. Somit konnte der Verbrauch der Standardreihen von  $18 \text{ } \mu\text{l}$  auf  $7,5 \text{ } \mu\text{l}$  pro Konzentrationsstufe reduziert werden, bei gleicher Reproduzierbarkeit der Chimärismusbestimmung.

#### 4. Einteilung in Gruppen

Um die Chimärismusbestimmungen am TaqMan mit den extern ermittelten STR-PCR-Ergebnissen zu vergleichen, wurden Gruppen gebildet, die festgelegte Prozentspannen zusammenfassen. Dabei wurde versucht, die Einteilung nach der klinischen Relevanz der Chimärismusbestimmung vorzunehmen. So gab es eine erste Gruppe, in der Chimärismen eingeteilt waren, die in der klinischen Bewertung als Idealzustand nach der Transplantation anzusehen waren, also mit dem geringsten Risiko für ein Transplantatversagen oder Rezidiv einhergehen. Die zweite Gruppe beinhaltete Werte, die zunächst durch regelmäßige Kontrollen beobachtet werden sollten. In der dritten Gruppe waren die Chimärismusergebnisse eingeteilt, bei denen eine sofortige Kontrolle der Ergebnisse, z.B. im Rahmen einer Knochenmarksuntersuchung angeraten wurde, sowie eine vierte Gruppe mit Werten, bei denen eine Abstoßung oder ein Rezidiv wahrscheinlich erschien.

In Einteilung A wurde der Idealzustand enger gefasst, da in die erste Gruppe nur Chimärismuswerte  $\geq 99\%$  eingeschlossen wurden, in Einteilung B wurden in die erste Gruppe Chimärismen  $\geq 98\%$  eingeteilt.

Es wurden zwei Einteilungen vorgenommen mit folgenden Prozentschritten:

- **Einteilung A:**

1. Gruppe: Chimärismus  $\geq 99\%$
2. Gruppe: Chimärismus 98,9 - 96%
3. Gruppe: Chimärismus 95,9 - 90%
4. Gruppe: Chimärismus  $< 90\%$

- **Einteilung B:**

1. Gruppe: Chimärismus  $\geq 98\%$
2. Gruppe: Chimärismus 97,9- 96%
3. Gruppe: Chimärismus 95,9 – 90%
4. Gruppe: Chimärismus  $< 90\%$

## 5. Auswertung der Daten des TaqMan

Bei der Auswertung der TaqMan-PCR ergab sich für die Proben folgende Zuteilung zu den Gruppen:

- **Einteilung A:**

1. Gruppe ( $\geq 99\%$ ): 77 Proben/ 70,6%
2. Gruppe (98,9 – 96%): 27 Proben/ 24,8% (davon 18 bei 98%)
3. Gruppe (95,9 – 90%): drei Proben/ 2,8%
4. Gruppe ( $< 90\%$ ): zwei Proben/ 1,8%

- **Einteilung B:**

1. Gruppe ( $\geq 98\%$ ): 95 Proben/ 87,2%
2. Gruppe (97,9 – 96%): neun Proben/ 8,2%
3. Gruppe (95,9 – 90%): drei Proben/ 2,8%
4. Gruppe ( $< 90\%$ ): zwei Proben/ 1,8%

## 6. Vergleich der Daten

Die Proben der allelspezifischen PCR wurden direkt mit den extern ermittelten Daten der STR-PCR der Firma Agendix GmbH Dresden verglichen. Bezogen auf die oben aufgeführte Gruppeneinteilung ergaben sich folgende Übereinstimmungen, eine Abweichung von +/- 1% vorausgesetzt:

- **Einteilung A:**

1. Gruppe: 77 von 77 Proben (100%)
2. Gruppe: zehn von 27 Proben (37%)
3. Gruppe: eine von drei Proben (33%)
4. Gruppe: keine Übereinstimmung



Die Ergebnisse aus Dresden im Vergleich mit gleicher Zuteilung zu den Gruppen (Einteilung A) :

1. Gruppe: 104 Proben
2. Gruppe: drei Proben
3. Gruppe: zwei Proben
4. Gruppe: keine Probe

Probennummer/Gruppe	Wert Dresden	Wert Würzburg	Allel
229/06 Gruppe 2	99,9%	96,39%	11a
80/07 Gruppe 2	100%	96,82%	4a
173/07 Gruppe 2	99,4%	97,95%	7b
227/07 Gruppe 2	100%	98,84%	7b
239/07 Gruppe 2	99,7%	97,35%	10a
302/07 Gruppe 2	99,8%	98,12%	7b
324/07 Gruppe 2	99,5%	96,23%	10a
108/08 Gruppe 2	99,9%	98,82%	11a
304/08 Gruppe 2	99,7%	98,27%	10a
491/08 Gruppe 2	99,7%	97,28%	10a
479/09 Gruppe 2	99,7%	98,69%	8b
614/09 Gruppe 2	98,7%	97,66%	10a
710/09 Gruppe 2	99,6%	98,03%	7a
713/09 Gruppe 2	99,3%	96,68%	7a
716/09 Gruppe 2	99,4%	97,32%	4a
789/09 Gruppe 2	100%	98,67%	8b
1029/09 Gruppe 2	100%	98,31%	7b
131/06 Gruppe 3	94,20%	91,72%	7a
883/09 Gruppe 3	99,5%	93,67%	10a
619/09 Gruppe 4	98,9%	89,06%	10a
681/09 Gruppe 4	99,5%	89,49%	4a

**Tabelle 3:** Auflistung und Gegenüberstellung der abweichenden Werte der Gruppen 2 – 4 mit dazugehöriger Zielsequenz, anhand der die Bestimmung ausgewertet wurde.

Die Tabelle zeigt die Unterschiede der Gruppen 2 – 4 anhand der genauen Werte der Chimärismusberechnungen. Um mögliche Zusammenhänge der abweichenden Werte mit bestimmten Genorten darzustellen, sind die verwendeten Polymorphismen der RT-PCR ergänzt worden.

Ändert man die Einteilung zu den Gruppen, wie oben bereits erwähnt, ergeben sich folgende Probenzuteilungen und Übereinstimmungen:

- **Einteilung B:**
  1. Gruppe: 87 von 95 Proben (91,6%)
  2. Gruppe: keine Übereinstimmung
  3. Gruppe: eine von drei Proben (33%)
  4. Gruppe: keine Übereinstimmung

Auch hier die Ergebnisse aus Dresden im Vergleich mit gleicher Zuteilung zu den Gruppen (Einteilung B):

1. Gruppe: 104 Proben
2. Gruppe: keine Probe
3. Gruppe: zwei Proben
4. Gruppe: keine Probe

In der folgenden Abbildung wurden die einzelnen Proben aus Würzburg und Dresden im direkten Vergleich gegeneinander aufgetragen:



Bedeutung für den Patienten hat. Man kann also davon ausgehen, dass Proben, die nach der Chimärismusberechnung in die erste Gruppe eingeordnet wurden, auch sicher deren klinische Relevanz erfüllen.

Probennummer	Ergebnis Dresden	Ergebnis Würzburg	Allel
136/06	98,8%	99,37%	7a
143/06	99,4%	99,86%	7a
251/06	99,8%	99,98%	3
271/07	99,9%	99,99%	11a + 10b
278/07	99,5%	99,97%	7a
334/07	99,6%	99,97%	7a
459/07	99,9%	100%	4a
555/08	99,8%	99,99%	3
470/09	99,8%	99,99%	11a
633/09	99,7%	99,99%	7b
689/09	99,1%	99,78%	10a
633/09	99,7%	99,99%	7b
728/09	99,7%	99,99%	7b
733/09	99,7%	99,94%	7b
758/09	99,7%	99,93%	7a
796/09	99,3%	99,88%	10a
758/09	99,7%	99,93%	7a
818/09	99,4%	99,96%	6
848/09	99,4%	99,99%	6
908/09	99,5%	99,98%	7b
937/09	99,3%	99,97%	7b
947/09	99,8%	99,93%	7b
948/09	99,2%	99,75%	6
1025/09	99,6%	99,96%	6
1026/09	99,4%	99,99%	7b
1037/09	99,8%	99,95%	10a
1047/09	99,72%	99,91%	8b
1131/09	99,7%	99,94%	6
1134/09	99,4%	100%	7b

**Tabelle 4:** Auflistung der Proben und Chimärismen, die mittels RT-PCR ermittelt wurden und im Datenvergleich weniger sensitiv waren als die Bestimmungen aus Dresden mittels STR-PCR. Zusätzlich Zuordnung der verwendeten Polymorphismen zu den Proben.

## Diskussion

Die Bestimmung des Spender-Empfänger-Chimärismus nach Stammzelltransplantation hat sich mittlerweile zu einem festen Bestandteil der Überwachungsstrategien des Therapieerfolgs etabliert. Für die Bestimmung des Chimärismusstatus des Patienten gilt die Anwendung der STR-PCR nach wie vor als der Goldstandard<sup>[94]</sup>. Jedoch liegen die Schwachpunkte der STR-PCR in der geringen Sensitivität, bei der nur eine von 100 Zellen erkannt wird, sowie dem Verlust der Aussagekraft der Berechnung in den annähernd kompletten Chimärismen mit einem fast 100%igen Spenderanteil<sup>[62, 88, 89]</sup>.

Eine höhere Sensitivität verspricht hier die von Alizadeh et al.<sup>[59]</sup> entwickelte allelspezifische qRT-PCR, die eine von 1000 Zellen erkennen kann und damit auch bei fast kompletten Spenderchimärismen noch genaue Aussagen über den Anteil an Empfängerzellen liefert.

### 1. Allele

Die von Alizadeh et al.<sup>[59]</sup> zur Bestimmung herangezogenen Allele kamen in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht in ihrer Vollständigkeit zur Anwendung. Es zeigte sich, dass die Genloci 01b, 05a, 08a und 09a bei den Bestimmungen in der untersuchten DNA nicht zu finden waren und somit diese vier Polymorphismen nicht zur Auswertung beitragen konnten, obwohl z.B. der Marker 08a bei Alizadeh et al.<sup>[59]</sup> mit einer Informativität von 16,4% angegeben wurde und damit deutlich häufiger zur Anwendung kommen sollte als z.B. 05a mit einer Informativität von 1,8%.

Letztendlich blieben noch 12,5% der Empfänger-Spender-Paare ohne eine detektierbare Differenz in den allelspezifischen Polymorphismen, so dass diese Proben nicht mit der Real-time-PCR ausgewertet werden konnten und dadurch eine Bestimmung des Chimärismusstatus in einem externen Labor mittels der STR-PCR erfolgen musste. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei Alizadeh et al.<sup>[59]</sup> und anderen Arbeiten (vgl. Guz. et al.<sup>[95]</sup>), dort konnten bei 10% der untersuchten Paare kein differenter Genort gefunden werden.

Jacque et. al.<sup>[44]</sup> konnten im Gegensatz dazu in ihrer Datenauswertung jeden Patienten mittels der vorhandenen Allele auswerten.

Für die klinische Anwendbarkeit bedeutet es, dass trotz der relativ hohen Verfügbarkeit der RT-PCR im Patientenkollektiv fast immer ein gewisser Prozentsatz einzuberechnen ist, der dieser Methode nicht zur Verfügung steht und somit die Bestimmung mittels STR-PCR nach wie vor als alternative Untersuchungsmethode zur Anwendung kommen muss. Deshalb kann zum jetzigen Zeitpunkt die allelspezifische, quantitative Real-time-PCR nicht als einzige Möglichkeit zur Chimärismusbestimmung angesehen werden, bis weitere Marker zur Differenzierung gefunden sind.

Jedoch zeigte sich in den durchgeführten Assays zum Teil eine sehr hohe Sensitivität bis zu 0,01% der Ausgangskonzentration im Rahmen der Standardreihentestung, die auch in den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen<sup>[44, 68, 95]</sup> dargestellt werden konnte.

Nur die Genorte 03, 04b, 05b, 10b und 11a konnten nicht zuverlässig bis zu dieser Verdünnung nachgewiesen werden. Hierbei ist allerdings zu diskutieren, bis zu welchem Zyklus die Ct-Werte als verwertbar positiv angesehen werden. Alizadeh et al.<sup>[59]</sup> setzten die Grenze für das Vorhandensein des gesuchten Markers bei einem Ct-Wert von 36 Zyklen. Jenseits davon galt eine Detektion als negativ. Die Arbeit von Bach<sup>[61]</sup> beispielsweise orientierte sich hier ebenfalls an der Ct-Wert-Grenze von 36 Zyklen.

Werden höhere Ct-Werte als auswertbar angesehen, erreicht man auch eine höhere Sensitivität auf Kosten einer geringeren Spezifität. In dieser Arbeit wurde die Grenze für die Auswertung der Ct-Werte bei 40 Zyklen angenommen. Hierdurch ergab sich bei den Chimärismusberechnungen häufiger ein Wert von kleiner 100% Spender-zu-Empfängeranteil im Vergleich zu den extern ermittelten Daten. Inwiefern dieser Unterschied in der Datenauswertung klinische Konsequenzen nach sich zieht, ist zu überprüfen, da durch die Auswertung von höheren Ct-Werten keine Änderung der Gruppenzuordnung der Daten erfolgte. Die untersuchten Proben konnten trotzdem in die erste Gruppe (s. Kapitel 6 im Abschnitt Ergebnisse) eingeordnet werden. Ein Unterschied würde sich nur dann ergeben, wenn man die Einteilung anders vornimmt und z.B. bereits ab einem Wert von < 99,5% Spender-zu-Empfängeranteil eine weitere Abklärung des Chimärismusstatus durch invasivere Methoden fordern würde. In der Arbeit von Willasch et al.<sup>[96]</sup> beispielsweise wurde ein kompletter Chimärismus mit einem Anteil an Empfängerzellen < 0,1% definiert und es bestand im Bereich von 0,1-

0,5% bereits ein „low-level-mixed-Chimärismus“. Allerdings gab es bezüglich der Rezidivrate keinen Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen.

Zu überdenken ist auch, ob die oben beschriebene hohe Sensitivität mancher Genloci in Zusammenhang mit der von Alizadeh et al.<sup>[59]</sup> angegebenen Informativität der Polymorphismen zu einem bevorzugten Einsatz derjenigen Zielsequenzen führen sollte, die sowohl über eine hohe Sensitivität, als auch eine große Informativität verfügen. Sollte ein Patient zum Beispiel sowohl in der Zielsequenz 07b, als auch 10b vom Spender differieren, ist zunächst die Entscheidung zu treffen, für welche der beiden Polymorphismen man sich primär für die Verlaufskontrolle entscheidet. Da aber die Sequenz 10b, wie im Ergebnisteil dieser Arbeit beschrieben, in der Testung der Standardreihen nur bis zu einem Verdünnungsgrad von 0,33% sicher nachweisbar war, fallen also kleinere Anteile an Empfänger-DNA in der Probe aus der Detektion heraus und können nicht erkannt werden. Es liegt hier also nahe, sich in diesem Falle für den primären Einsatz der Sequenz 07b zu entscheiden, da sie bei annähernd gleicher Informativität (vgl. Alizadeh et al.<sup>[59]</sup>) eine deutlich höhere Sensitivität aufweist. Bezieht man die Ergebnisse der Verteilung der Genorte bei den Patienten mit ein, die in dieser Arbeit ausgewertet wurden (vgl. Tabelle 1), spricht auch die Häufigkeit für die Verwendung von 07b. Anhand solcher Überlegungen lässt sich durchaus eine Einteilung vornehmen in zu bevorzugende und zu vernachlässigende Genloci - für den Fall, dass ein Empfänger-Spender-Paar mehrere unterschiedliche Zielsequenzen aufweist. Eine mögliche „Rankingliste“ der Genorte zeigt die unten aufgeführte Tabelle:

	<b>Allele</b>
<b>Höhere Sensitivität und Informativität</b>	01a, SRY, 04a, 06, 07a, 07b, 08b, 10a
<b>Geringere Sensitivität und Informativität</b>	03, 04b, 05b, 09b, 10b, 11a, 11b

**Tabelle 5:** Zuteilung der Genorte je nach Sensitivität und Informativität (vgl. Alizadeh et al. 2002). Bevorzugt sollten die Genloci der oberen Spalte eingesetzt werden, da sie mit einer höheren Sensitivität und Informativität einhergehen.

Bach et al.<sup>[61]</sup> prüften die unterschiedlichen Allele in ihrer Arbeit ebenfalls auf ihre Informativität und Korrelation der PCR mit erstellten Eichkurven (s. Kapitel 2 im

Abschnitt Diskussion) in ihrem Patientenkollektiv und kamen zu ähnlichen, jedoch leicht abweichenden Ergebnissen, so dass bzgl. der Allele, die ggf. bevorzugt behandelt werden sollten, keine allgemeingültige Auswahl getroffen werden kann. Allerdings sollten hier auch die Gegebenheiten der Population, aus der die Proben gewonnen werden, in die Auswahl einfließen, da diese geringfügig abweichen können.

## 2. Standardreihen

Die entwickelten allelspezifischen Standardreihen wurden als externe Eichkurve zur Standardisierung der Ergebnisse der quantitativen Real-time-PCR verwendet. Eine solche Kontrollmöglichkeit der Werte ist weit verbreitet<sup>[61, 96]</sup>. Eine lineare Korrelation von  $r = 1,00$  gilt als Ideal, angestrebt wurde eine Korrelation mit  $r > 0,98$ .

Da die Verdünnungen immer als Triplets mitgeführt wurden, konnten Ausreißer in den einzelnen Werten schneller erkannt werden. Somit konnten diese Werte aus der Berechnung ausgeschlossen werden. Allerdings zeigte sich nicht immer eine lineare Korrelation mit  $r > 0,98$ . Verunreinigungen, ungenaues Arbeiten oder ähnliche Störfaktoren bewirkten häufiger eine Veränderung der Eichkurve, die bei jedem PCR-Lauf neu angelegt wurde. Da dieselben Standardreihen zum Teil über einen Zeitraum von mehreren Wochen zum Einsatz kamen, musste man auch hier von einem Abbau der enthaltenen DNA ausgehen, der sich in einer Verschiebung der Ct-Werte der unterschiedlichen Verdünnungsstufen in Richtung einer späteren Detektion bemerkbar machte.

Aufgrund dessen ist für zukünftige Berechnungen zu überlegen, ob für jeden einzelnen Polymorphismus eine Eichkurve mit annähernd idealer Korrelation der Werte gespeichert wird und die im Verlauf bestimmten Proben mit dieser Idealreihe verglichen werden. Von Vorteil wäre hierbei, dass sowohl Arbeitszeit eingespart werden kann, da nicht bei jedem PCR-Lauf 18 Mikroreaktionsgefäße der 96 Stück umfassenden PCR-Platte für die allelspezifische Standardreihe bestückt werden müssen, als auch ein geringerer Verbrauch von Material in Form von Mastermixmenge und Standardreihen anfällt, was sich positiv auf die entstehenden Kosten für den Assay auswirkt.

Allerdings können somit auch interassayspezifische Veränderungen, z.B. die Funktionalität der Primer und Sonden nicht berücksichtigt werden, wodurch die



Kalibrierung der Proben anhand der Eichkurve zu Unterschieden zwischen tatsächlichem und berechnetem DNA-Gehalt bzw. Chimärismusstatus führen könnte. Ein weiteres Problem liegt in der internen Standardisierung, die durch die Bestimmung von HCK als Housekeeping-Gen bei den unterschiedlichen Verdünnungsstufen der Standardreihen, sowie der Proben vorgenommen wird. Der Sinn einer solchen Standardisierung ist es, quantitative und qualitative Unterschiede im PCR-Ergebnis zu relativieren. Da diese Gene in jeder Zelle eines Individuums in der gleichen Menge exprimiert werden und interindividuelle Abweichungen sehr gering sind, kann man dadurch Rückschlüsse auf den vorhandenen DNA-Gehalt einer Probe ziehen. Allerdings sind die Werte der HCK-Bestimmungen nur einer Chimärismusberechnung zugänglich, wenn der HCK-Ct-Wert früher detektiert wird als der Ct-Wert der allelspezifischen Probe. Im anderen Falle ergibt die Formel zur Chimärismusbestimmung negative Chimärismen, die nicht auswertbar sind. Bei den untersuchten Proben trat dies bei vier Proben auf. Es stellt sich die Frage, in wie weit es häufiger zu negativen Werten bei der Chimärismusberechnung kommt, wenn die interne Standardisierung mittels HCK-Bestimmung von Standardreihen und Patientenproben mit der abgespeicherten idealen externen Eichkurve verglichen wird, statt mit einer im gleichen Lauf angelegten externen Eichkurve.

### 3. Gruppeneinteilung

Die im Ergebnisteil vorgenommenen Gruppeneinteilungen A und B sind in erster Linie als klinische Bewertungssysteme der Ergebnisse der Chimärismusberechnung zu sehen. Wie dort schon aufgeführt, soll damit eine Einordnung in den klinischen Zusammenhang zwischen Chimärismusstatus und damit einhergehender Konsequenz in der Überwachung des Therapieerfolgs ermöglicht werden. Wichtig ist, dass die Bewertung der Zuteilung zu den Gruppen sich immer auch an klinischen Parametern orientiert. Beispielsweise kann in den ersten Wochen nach Transplantation und Myeloablation durchaus noch ein gemischter Chimärismus bestehen, der sich aber relativ bald zu einem kompletten Spenderchimärismus ausbilden sollte<sup>[62, 97]</sup>. In dieser Zeit ist die Bewertung des Chimärismusstatus nicht von einem einzelnen Wert abhängig zu machen, sondern viel mehr von der Entwicklung des Chimärismus von

Spenderzellanteil zu Empfängerzellanteil. Hier macht also die Zuteilung zu den oben aufgeführten Gruppen nur bedingt Sinn bzw. sollte losgelöst sein von dem im späteren Verlauf nach Stammzelltransplantation durchaus zweckmäßigen Handlungsschema, das durch die Eingruppierung der Werte ermöglicht wird.

Die unterschiedlichen Einteilungen A und B der Chimärismuswerte haben ausschließlich Auswirkungen in den Gruppen 1 und 2. Zu überlegen ist, welche Spannweite für die erste Gruppe, deren Werte man ja als unbedenklich für den Patienten ansieht, in der klinischen Anwendung am sinnvollsten ist. Sind Spenderanteile von 98-99% noch ausreichend, um von einem stabilen Chimärismus auszugehen oder sind es erste Warnzeichen für eine mögliche Abstoßung des Transplantats oder Rezidivs der Grunderkrankung?

Die für den Patienten sicherste Einteilung ist gewiss Einteilung A, da hier bei einem Wert von beispielsweise 98,7% für den behandelnden Arzt ein erstes Warnsignal gesetzt wird und die Werte einer eingehenderen Beobachtung zugeführt werden sollten. Natürlich kann dies zu einer übermäßigen Vorsicht führen und gegebenenfalls in einer verfrühten oder unnötigen invasiven Kontrolle des Transplantationsstatus durch eine Knochenmarkspunktion enden, wodurch sich für den Patienten auch eine psychisch belastende Situation ergibt. Allerdings ist im Falle einer richtig positiven Zuteilung mit der Konsequenz einer Abstoßung/Rückkehr der Grunderkrankung somit auch die Möglichkeit gegeben, zum frühestmöglichen Zeitpunkt eine Intervention einzuleiten.

Bach et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass die qRT-PCR in der Früherkennung eines Rezidivs der STR-PCR überlegen und die damit verbundene zeitnahe Therapieeinleitung für den Patienten von Vorteil ist<sup>[61]</sup>.

In der zweiten Gruppe zeigt sich gleichzeitig, dass der Großteil der dort eingeteilten Werte bei 98–99% liegt und somit nicht einem kleineren Spenderanteil zugeordnet werden muss. Die Bewertung dieses Bereiches – zwischen höchstwahrscheinlich ungefährlich für den Patienten oder dem Zwang einer intensiven Überwachung - ist nicht eindeutig und lässt die Überlegung zu, eine zusätzliche Gruppe für diese Werte einzuführen, die in Folge jedoch auch eine neue klinische Abschätzung notwendig macht. Der Konflikt, der sich hier zeigt, wird im Vergleich mit den extern erhobenen Daten noch deutlicher (s. Kapitel 4 im Abschnitt Diskussion).

In der Arbeit von Willasch et al.<sup>[96]</sup> wurden bereits ab einem Chimärismusanteil von

> 0,5% engmaschigere Kontrollen vorgenommen, da ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Rezidivs gesehen wurde. Allerdings ist das Vorhandensein von Empfängerzellen nicht gleichzusetzen mit einem Rezidiv, so dass in der Bewertung des Chimärismus unbedingt der zeitliche Verlauf einberechnet werden sollte<sup>[61]</sup>.

#### 4. Vergleich der Daten

Sieht man sich die extern ermittelten Chimärismuswerte an, die auf der Amplifikation von short tandem repeats in der PCR basieren, so stellt man fest, dass bei beiden Einteilungen deutlich mehr Werte der ersten Gruppe zugeordnet werden können, als es bei den Ergebnissen der allelspezifischen quantitativen Real-time-PCR der Fall ist. In der vierten Gruppe gibt es sogar überhaupt kein dort einzuordnendes Ergebnis aus Dresden.

Ersteres wäre durch die größere Sensitivität der qRT-PCR erklärbar, da dort im Gegensatz zur STR-PCR bereits eine von 1000 Zellen erkannt wird und es nicht zu einem Verlust der Aussagekraft bei fast totalem Spenderchimärismus kommt wie bei der STR-PCR<sup>[62]</sup>. Hierdurch könnten nun häufiger gemischte Chimärismen in diesem Bereich detektiert werden, die einer Erkennung durch die STR-PCR verborgen bleiben. Auch andere Arbeiten sehen den Nachteil der STR-PCR in der späteren Detektion von gemischten Chimärismen<sup>[44, 60, 61]</sup>, so dass ein Rezidiv möglicherweise zu spät erkannt wird.

Letzteres könnte sich dadurch erklären, dass die TaqMan-basierte RT-PCR ab einem Anteil von ca. 5% der Empfängerzellen weniger zuverlässige Werte liefert, als die STR-PCR<sup>[59]</sup>. Je höher der Empfängerzellanteil ist, desto ungenauer werden die Berechnungen und weichen in größerem Rahmen von der tatsächlichen Zellzahl ab. Bei über 10% Empfängerzellen ist die Aussagekraft deutlich eingeschränkt<sup>[81]</sup>. Somit könnten sich die Zuordnungen der Werte zu Gruppe 4 in den Ergebnissen der qRT-PCR dadurch erklären, dass ab dem oben erwähnten Empfängerzellanteil die Werte höheren Schwankungen unterliegen und somit leichter in diese Gruppe fallen.

Fraglich ist aber, ob es sich mit den Werten der dritten Gruppe ähnlich verhält. Schließlich ergeben in den Würzburger Messungen drei Proben Chimärismen, die in diese Gruppe eingeteilt werden, während es bei den externen Daten nur zwei Proben

sind und, eine Abweichung von +/- 1% vorausgesetzt, es im direkten Vergleich sogar nur eine einzige Übereinstimmung der Daten gibt. Stellt man nun noch die genauen Werte dieser Gruppe gegenüber, zeigt sich eine deutliche Abweichung der ermittelten Werte voneinander (vgl. Tabelle 3).

Welche Bedeutung das für die Aussagekraft des allelspezifischen Assays hat, ist nicht ganz klar. Bei den in Tabelle 3 aufgelisteten differentiellen Werten fällt auf, dass in einem Drittel der Fälle der Genort 10a zur Bestimmung verwendet wurde. Möglicherweise ist die Spezifität dieses Polymorphismus zu gering. Um einer falsch positiven Einordnung in eine der Gruppen 2 – 4 vorzubeugen, sollten in diesen Fällen unbedingt die Laufbedingungen kontrolliert werden, indem zunächst der Lauf mit dem gleichen Genort wiederholt wird oder im Falle einer weiteren vorhandenen differentiellen Zielsequenz diese alternativ genutzt wird. Weiterhin ist zu überlegen, ob in solchen Situationen die auffällige Probe einer externen Untersuchung mittels STR-PCR zugeführt wird, um eine zusätzliche Kontrollmöglichkeit zu besitzen. Auch wenn diese Konstellationen bei den Ergebnissen nicht häufig anzutreffen waren, ist es doch wichtig für die klinische Einschätzung, zuverlässige Werte zu haben, um dem Patienten die zusätzliche Belastung von unnötigen Untersuchungen zu ersparen.

Andererseits kann zum jetzigen Zeitpunkt auch nicht mit eindeutiger Sicherheit gesagt werden, ob bei den abweichenden Ergebnissen nicht möglicherweise in der Prospektive eine Abstoßung oder ein Rezidiv auftraten. Eine Untersuchung des klinischen Verlaufs der Patientengeschichte könnte möglicherweise darüber Aufschluss geben.

Zusammengefasst sind die Daten der Gruppen 2 - 4 bezogen auf die Sensitivität und Spezifität der qRT-PCR relativ unbefriedigend. Da die Ergebnisse aber nicht im klinischen Kontext betrachtet wurden, ist es schwierig, ein endgültiges Resümee daraus zu ziehen. Für die Durchführung des Assays als Routineuntersuchung sollte es eindeutige Handlungsalgorithmen geben, auf welche Weise mit solchen Werten zu verfahren ist. Bisher ist dies generell für die Interpretation der Ergebnisse und die unterschiedlichen Techniken nicht standardisiert<sup>[98]</sup>. Zusätzlich ist die klinische Einschätzung der Werte in Zusammenhang mit dem klinischen Bild wichtig, die nicht Teil dieser Arbeit waren.

In der neueren Entwicklung gibt es aber Bestrebungen, gerade dieses Problem der qRT-PCR zu beheben – mit der Methode der digitalen PCR, die verspricht, bei gemischten Chimärismen > 5% gleichwertige Daten wie die STR-PCR zu liefern<sup>[81]</sup>.

Betrachtet man nun die Ergebnisse der ersten Gruppe, so ist zumindest in der Einteilung A eine komplette Übereinstimmung der Werte anzutreffen. Selbst in der Einteilung B, die wie im Kapitel 3 des Diskussionsteils schon beschrieben mit gewissen Unsicherheiten für den Patienten einhergeht, liegt der Anteil der übereinstimmenden Werte bei 91,6%. Das bedeutet, dass die allelspezifische Real-time-PCR mindestens genau so sicher wie die STR-PCR die Proben, deren Chimärismusstatus einem annähernd kompletten oder absolut kompletten Spenderzellanteil entspricht, auch als solche erkennt.

Als schlimmster Fall bei der Auswertung der Daten musste die Situation angesehen werden, bei der die quantitative Real-time-PCR vorhandene Empfängerzellanteile nicht detektiert, sondern bei der Berechnung einen vollständigen Spenderchimärismus ergibt. Im Vergleich der Daten mit den extern erhobenen STR-PCR-Ergebnissen war dies, bezogen auf die Gruppenzuteilung, in keiner einzigen Gegenüberstellung der Fall.

Prüft man nun die Werte im Direktvergleich, so zeigt sich, dass bei 29 Proben aus Würzburg ein höherer Anteil an Spenderzellen detektiert wird, als dies bei den Ergebnissen aus Dresden geschah. Allerdings bewegt sich die Abweichung der Werte bei maximal 0,68%, minimal sind es sogar nur 0,1% Abweichung. Sieht man sich die Werte an, so stellt man fest, dass sie alle zur ersten Gruppe gehören und damit in der klinischen Bewertung keine Auswirkungen auf den Handlungsablauf in der posttransplantationellen Therapieüberwachung haben.

Damit hat sich gezeigt, dass die allelspezifische RT-PCR keinen Anlass zur Annahme gibt, einen richtig positiven Wert erneut zu kontrollieren. Er kann als sicher angesehen werden und somit unbedenklich in die klinische Bewertung mit einbezogen werden.

Zusammenfassend für den Assay bedeutet das also, dass er zwar im Bereich der Gruppen 2 – 4, also denjenigen mit einem durchaus bedenklichen Empfängerzellanteil, durchaus zu sensitiv reagiert, jedoch sicher keinen Anteil an Empfängerzellen übersieht, der in der STR-PCR vorhanden wäre. Dadurch kann es zwar zu unnötigen Eingriffen und Beunruhigung des Patienten kommen, jedoch nicht zum schlimmsten Fall: Dass eine Abstoßung oder ein Rezidiv übersehen wird.

Zu diesem Ergebnis kommen auch Jacque et al.<sup>[44]</sup>: Der negative prädiktive Wert der allelspezifischen qRT-PCR ist exzellent.

Damit sie bei gemischten Chimärismen an die Ergebnisse der STR-PCR herankommt, sind aber Verfeinerungen der Methode notwendig, wie sie z.B. mit der digitalen PCR in Ausblick gestellt werden<sup>[81]</sup>.

Zum aktuellen Zeitpunkt hat sich an der Universität Würzburg die Verwendung der allelspezifischen quantitativen RT-PCR allerdings soweit etabliert, dass dort jährlich über 1000 Patientenproben aus der Kinderklinik und der Hämato-Onkologie der medizinischen Klinik und Poliklinik mit diesem Verfahren in der Routineanwendung ausgewertet werden können. Ein Probenversand zur Durchführung einer STR-PCR zur Firma Agendix GmbH nach Dresden ist mittlerweile nicht mehr notwendig.

## **Zusammenfassung**

Neben Infektionen und Graft-versus-Host-Reaktionen nach allogener Stammzelltransplantation, stellen das Rezidiv der Grunderkrankungen und die Transplantatabstoßung die schwerwiegendsten Probleme bei diesem Patientenkollektiv dar. Um jene frühzeitig zu erkennen, werden Chimärismusanalysen eingesetzt, mit deren Hilfe das Auftauchen kleinster Mengen an Empfängerknorpelmarkszellen im peripheren Blut nachgewiesen werden können.

Hierfür stehen verschiedene Möglichkeiten mit unterschiedlichen Sensitivitäten und Anwendungsbereichen zur Verfügung, wie die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), die Amplifikation von short tandem repeats (STR) mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und die allelspezifische quantitative Real-time-PCR (qRT-PCR) mittels TaqMan, um die es in dieser Arbeit geht.

Mit Hilfe von speziellen Zielsequenzen auf unterschiedlichen Allelen, die Alizadeh et al. 2002 veröffentlichten, kann in der qRT-PCR bereits eine von 1000 Zellen nachgewiesen werden und somit zu einem frühen Zeitpunkt ein mögliches Rezidiv oder eine Abstoßung erkannt werden.

In dieser Arbeit wurden für die beschriebenen Allele und das SRY-Gen Standardreihen mit unterschiedlichen Konzentrationsstufen erstellt, mit Hilfe derer man die Ergebnisse der PCR aus Patientenproben einordnen und den Chimärismus berechnen konnte. Eine zusätzliche Kalibrierung der Proben wurde mit Standardreihen vorbestimmter Konzentrationsstufen des Housekeeping-Gens HCK durchgeführt, das auch bei der Auswertung der Patientenproben zum Einsatz kam.

Somit war es im Rahmen der Etablierung der PCR an der Uniklinik Würzburg möglich, in dieser Arbeit 395 Proben zu bestimmen, von denen 127 Proben von 26 Patienten ausgewertet und mit extern ermittelten STR-PCR-Ergebnissen verglichen werden konnten.

Die hieraus gewonnenen Daten wurden mit den von Alizadeh et al.<sup>[59]</sup> veröffentlichten Daten verglichen bezüglich der Anwendbarkeit der allelspezifischen PCR auf das Patientenkollektiv der Uniklinik Würzburg und der Auswertung ihrer Sensitivität sowie klinischen Verwendbarkeit.

Um die ermittelten Chimärismen in einen klinischen Zusammenhang zu stellen, erfolgte die Zuordnung zu vier Gruppen mit verschiedenen Prozentspannen, bei denen unterschiedliche Szenarien in der klinischen Bewertung durchgespielt wurden.

Die Schwächen der etablierten PCR bestanden vor allem darin, dass 12,5% der Proben dieser Methode nicht zugänglich waren und angenommen werden muss, dass der Assay z.T. zu sensitiv war. Gerade in einem Bereich von  $> 5\%$  igen Chimärismen stimmten die erhobenen Daten nicht mehr mit den Kontrollen überein, sondern gaben möglicherweise falsch hohe Chimärismen an.

Fehlende prospektive Daten machten es nicht möglich, in der Arbeit unstimmmige Werte durch Beobachtung des weiteren klinischen Verlaufs auf ihre Richtigkeit zu prüfen.

Für die weitere Bewertung des Assays wäre es wichtig, dies in zukünftige Untersuchungen mit einzubeziehen.



## Literaturverzeichnis

1. Speer CP, Gahr M. **Pädiatrie**. 3 ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2009.
2. Apperley J, Niederwieser D, Huang XJ, Nagler A, Fuchs E, Szer J, et al. **Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Global Overview Comparing Asia, the European Union, and the United States**. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2016; 22(1):23-26.
3. Bornhauser M, Theuser C, Soucek S, Holig K, Klingebiel T, Blau W, et al. **Allogeneic transplantation of G-CSF mobilized peripheral blood stem cells from unrelated donors: a retrospective analysis**. *Haematologica* 2000; 85(8):839-847.
4. Urbano-Ispizua A, Schmitz N, de Witte T, Frassoni F, Rosti G, Schrezenmeier H, et al. **Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe**. *Bone marrow transplantation* 2002; 29(8):639-646.
5. Dey BR, Spitzer TR. **Current status of haploidentical stem cell transplantation**. *British journal of haematology* 2006; 135(4):423-437.
6. Appelbaum FR. **Allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia when a matched related donor is not available**. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008:412-417.
7. Kanate AS, Mussetti A, Kharfan-Dabaja MA, Ahn KW, DiGilio A, Beitinjaneh A, et al. **Reduced-intensity transplantation for lymphomas using haploidentical related donors vs HLA-matched unrelated donors**. *Blood* 2016; 127(7):938-947.
8. Booth C, Lawson S, Veys P. **The current role of T cell depletion in paediatric stem cell transplantation**. *British journal of haematology* 2013; 162(2):177-190.
9. Ballen KK, Gluckman E, Broxmeyer HE. **Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond**. *Blood* 2013; 122(4):491-498.
10. Castagna L, Blaise D, Furst S. **[Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in elderly]**. *Bull Cancer* 2011; 98(8):915-925.
11. William BM, de Lima M. **Advances in conditioning regimens for older adults undergoing allogeneic stem cell transplantation to treat hematologic malignancies**. *Drugs Aging* 2013; 30(6):373-381.

12. Sorror ML, Estey E. **Allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia in older adults.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2014; 2014(1):21-33.
13. Copelan EA. **Hematopoietic stem-cell transplantation.** *The New England journal of medicine* 2006; 354(17):1813-1826.
14. Rank A, Kolb H-J. **Stammzelltransplantation.** In: *Facharzt Hämatologie Onkologie*, 1 edn. München: Urban & Fischer, Elsevier; 2007.
15. Horowitz MM GR, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringdén O, Rozman C, Speck B, et al. **Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation.** *Blood* 1990; 75(3):555-562.
16. Maris M, Woolfrey A, McSweeney PA, Sandmaier BM, Nash RA, Georges G, et al. **Nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation: transplantation for the 21st century.** *Front Biosci* 2001; 6:G13-16.
17. Arai S, Vogelsang GB. **Management of graft-versus-host disease.** *Blood Rev* 2000; 14(4):190-204.
18. Lu DP, Dong L, Wu T, Huang XJ, Zhang MJ, Han W, et al. **Conditioning including antithymocyte globulin followed by unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical blood and marrow transplantation can achieve comparable outcomes with HLA-identical sibling transplantation.** *Blood* 2006; 107(8):3065-3073.
19. Gratwohl A, Baldomero H, Gratwohl M, Aljurf M, Bouzas LF, Horowitz M, et al. **Quantitative and qualitative differences in use and trends of hematopoietic stem cell transplantation: a Global Observational Study.** *Haematologica* 2013; 98(8):1282-1290.
20. Ringden O. **Allogeneic bone marrow transplantation for hematological malignancies--controversies and recent advances.** *Acta Oncol* 1997; 36(6):549-564.
21. Giagounidis A. [Myelodysplastic syndromes]. *Internist (Berl)* 2013; 54(6):699-708.
22. Schmitz N. [Therapy of highly malignant non-Hodgkin lymphoma with high-dose chemotherapy and stem cell transplantation]. *Praxis (Bern 1994)* 1998; 87(25-26):863-868.

23. Navari RM. **Management of chemotherapy-induced nausea and vomiting : focus on newer agents and new uses for older agents.** *Drugs* 2013; 73(3):249-262.
24. Villa A, Sonis ST. **Pharmacotherapy for the management of cancer regimen-related oral mucositis.** *Expert Opin Pharmacother* 2016:1-7.
25. Furrer K, Schaffner A, Vavricka SR, Halter J, Imhof A, Schanz U. **Nephrotoxicity of cyclosporine A and amphotericin B-deoxycholate as continuous infusion in allogeneic stem cell transplantation.** *Swiss Med Wkly* 2002; 132(23-24):316-320.
26. Zeng L, An L, Fang T, Pan B, Sun H, Chen C, et al. **A murine model of hepatic veno-occlusive disease induced by allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.** *Cell Biochem Biophys* 2013; 67(3):939-948.
27. Smith LA, Wright-Kanuth MS. **Complications and risks in hematopoietic stem cell transplant patients.** *Clin Lab Sci* 2001; 14(2):118-124.
28. Sahin U, Toprak SK, Atilla PA, Atilla E, Demirer T. **An overview of infectious complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.** *J Infect Chemother* 2016; 22(8):505-514.
29. Azevedo LS, Pierrotti LC, Abdala E, Costa SF, Strabelli TM, Campos SV, et al. **Cytomegalovirus infection in transplant recipients.** *Clinics (Sao Paulo)* 2015; 70(7):515-523.
30. Hong KT, Kang HJ, Kim NH, Kim MS, Lee JW, Kim H, et al. **Peri-engraftment syndrome in allogeneic hematopoietic SCT.** *Bone marrow transplantation* 2013; 48(4):523-528.
31. Mohty M, Apperley JF. **Long-term physiological side effects after allogeneic bone marrow transplantation.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010; 2010:229-236.
32. Couriel D, Caldera H, Champlin R, Komanduri K. **Acute graft-versus-host disease: pathophysiology, clinical manifestations, and management.** *Cancer* 2004; 101(9):1936-1946.
33. Vogelsang GB, Hess AD. **Graft-versus-host disease: new directions for a persistent problem.** *Blood* 1994; 84(7):2061-2067.
34. Zeiser R, Socie G, Blazar BR. **Pathogenesis of acute graft-versus-host disease: from intestinal microbiota alterations to donor T cell activation.** *British journal of haematology* 2016.

35. Jacobsohn DA, Vogelsang GB. **Acute graft versus host disease.** *Orphanet J Rare Dis* 2007; 2:35.
36. Luznik L, Bolanos-Meade J, Zahurak M, Chen AR, Smith BD, Brodsky R, et al. **High-dose cyclophosphamide as single-agent, short-course prophylaxis of graft-versus-host disease.** *Blood* 2010; 115(16):3224-3230.
37. Luznik L, Fuchs EJ. **High-dose, post-transplantation cyclophosphamide to promote graft-host tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.** *Immunol Res* 2010; 47(1-3):65-77.
38. Holtan SG, Khera N, Levine JE, Chai X, Storer B, Liu HD, et al. **Late acute graft versus host disease: a prospective analysis of clinical outcomes and circulating angiogenic factors.** *Blood* 2016.
39. Tyndall A, Dazzi F. **Chronic GVHD as an autoimmune disease.** *Best Pract Res Clin Haematol* 2008; 21(2):281-289.
40. Bertheas MF, Lafage M, Levy P, Blaise D, Stoppa AM, Viens P, et al. **Influence of mixed chimerism on the results of allogeneic bone marrow transplantation for leukemia.** *Blood* 1991; 78(11):3103-3106.
41. Jiang Y, Wan LP, Qin YW, Wang XR, Yan SK, Xie KC, et al. **Chimerism status is correlated to acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation.** *International journal of hematology* 2014; 99(3):323-328.
42. Servais S, Beguin Y, Baron F. **Emerging drugs for prevention of graft failure after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.** *Expert Opin Emerg Drugs* 2013; 18(2):173-192.
43. Alpdogan O. **Advances in immune regulation in transplantation.** *Discov Med* 2013; 15(82):150-159.
44. Jacque N, Nguyen S, Golmard JL, Uzunov M, Garnier A, Leblond V, et al. **Chimerism analysis in peripheral blood using indel quantitative real-time PCR is a useful tool to predict post-transplant relapse in acute leukemia.** *Bone marrow transplantation* 2015; 50(2):259-265.
45. Willemsse MJ, Seriu T, Hettinger K, d'Aniello E, Hop WC, Panzer-Grumayer ER, et al. **Detection of minimal residual disease identifies differences in treatment response between T-ALL and precursor B-ALL.** *Blood* 2002; 99(12):4386-4393.

46. Zhou Y, Slack R, Jorgensen JL, Wang SA, Rondon G, de Lima M, et al. **The effect of peritransplant minimal residual disease in adults with acute lymphoblastic leukemia undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.** *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2014; 14(4):319-326.
47. Bader P, Beck J, Frey A, Schlegel PG, Hebarth H, Handgretinger R, et al. **Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT.** *Bone marrow transplantation* 1998; 21(5):487-495.
48. Horky O, Mayer J, Kablaskova L, Razga F, Krejci M, Kissova J, et al. **Increasing hematopoietic microchimerism is a reliable indicator of incipient AML relapse.** *International journal of laboratory hematology* 2011; 33(1):57-66.
49. Slavin S, Naparstek E, Nagler A, Ackerstein A, Samuel S, Kapelushnik J, et al. **Allogeneic cell therapy with donor peripheral blood cells and recombinant human interleukin-2 to treat leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation.** *Blood* 1996; 87(6):2195-2204.
50. Kolb HJ, Schmid C, Barrett AJ, Schendel DJ. **Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras.** *Blood* 2004; 103(3):767-776.
51. Fujii S, Shimizu K, Fujimoto K, Kiyokawa T, Tsukamoto A, Sanada I, et al. **Treatment of post-transplanted, relapsed patients with hematological malignancies by infusion of HLA-matched, allogeneic-dendritic cells (DCs) pulsed with irradiated tumor cells and primed T cells.** *Leukemia & lymphoma* 2001; 42(3):357-369.
52. Richardson SE, Khan I, Rawstron A, Sudak J, Edwards N, Verfuert S, et al. **Risk-stratified adoptive cellular therapy following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for advanced chronic lymphocytic leukaemia.** *British journal of haematology* 2013; 160(5):640-648.
53. Marianne Strzysch JW. **Brockhaus. Bd. 2. Bav – Chi.** In: *Der Brockhaus: in 15 Bänden* Leipzig; Mannheim: Die Deutsche Bibliothek 1997. pp. ISBN 3-7643-2821-7649.
54. Psychrembel. **Klinisches Wörterbuch.** 260. ed. **Berlin:** Walter de Gruyter; 2004.
55. Choi SJ, Lee KH, Lee JH, Kim S, Chung HJ, Lee JS, et al. **Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone**

**marrow transplantation: a prospective study.** *Bone marrow transplantation* 2000; 26(3):327-332.

56. Rauwerdink CA, Tsongalis GJ, Tosteson TD, Hill JM, Meehan KR. **The practical application of chimerism analyses in allogeneic stem cell transplant recipients: blood chimerism is equivalent to marrow chimerism.** *Experimental and molecular pathology* 2012; 93(3):339-344.

57. Wessman M, Ruutu T, Volin L, Knuutila S. **In situ hybridization using a Y-specific probe--a sensitive method for distinguishing residual male recipient cells from female donor cells in bone marrow transplantation.** *Bone marrow transplantation* 1989; 4(3):283-286.

58. Thiede C, Florek M, Bornhauser M, Ritter M, Mohr B, Brendel C, et al. **Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection.** *Bone marrow transplantation* 1999; 23(10):1055-1060.

59. Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, et al. **Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction.** *Blood* 2002; 99(12):4618-4625.

60. Koldehoff M, Steckel NK, Hlinka M, Beelen DW, Elmaagacli AH. **Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real-time polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphisms, standard tandem repeats, and Y-chromosome-specific sequences.** *American journal of hematology* 2006; 81(10):735-746.

61. Bach C, Tomova E, Goldmann K, Weisbach V, Roesler W, Mackensen A, et al. **Monitoring of hematopoietic chimerism by real-time quantitative PCR of micro insertions/deletions in samples with low DNA quantities.** *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* 2015; 42(1):38-45.

62. Fehse B, Chukhlovin A, Kuhlcke K, Marinetz O, Vorwig O, Renges H, et al. **Real-time quantitative Y chromosome-specific PCR (QYCS-PCR) for monitoring hematopoietic chimerism after sex-mismatched allogeneic stem cell transplantation.** *Journal of hematotherapy & stem cell research* 2001; 10(3):419-425.

63. Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S, et al. **Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification.** *Anal Chem* 2012; 84(2):1003-1011.
64. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, et al. **High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number.** *Anal Chem* 2011; 83(22):8604-8610.
65. Müllhardt C. **Der Experimentator. Molekularbiologie/Genomics.** 6 ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009.
66. Gerritsen WR, Jagiello CA, Bourhis JH. **Detection of chimerism in subpopulations of cells by fluorescence in situ hybridization and immunofluorescent staining of cell surface antigens.** *Bone marrow transplantation* 1994; 13(4):441-447.
67. Kristt D, Stein J, Yaniv I, Klein T. **Assessing quantitative chimerism longitudinally: technical considerations, clinical applications and routine feasibility.** *Bone marrow transplantation* 2007; 39(5):255-268.
68. Frankfurt O, Zitzner JR, Tambur AR. **Real-time qPCR for chimerism assessment in allogeneic hematopoietic stem cell transplants from unrelated adult and double umbilical cord blood.** *Human immunology* 2015; 76(2-3):155-160.
69. Broman KW, Murray JC, Sheffield VC, White RL, Weber JL. **Comprehensive human genetic maps: individual and sex-specific variation in recombination.** *Am J Hum Genet* 1998; 63(3):861-869.
70. Thiede C. **Diagnostic chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation: new methods and markers.** *American journal of pharmacogenomics : genomics-related research in drug development and clinical practice* 2004; 4(3):177-187.
71. Elmaagacli AH. **Real-time PCR for monitoring minimal residual disease and chimerism in patients after allogeneic transplantation.** *International journal of hematology* 2002; 76 Suppl 2:204-205.
72. Kashimada K, Koopman P. **Sry: the master switch in mammalian sex determination.** *Development* 2010; 137(23):3921-3930.

73. Coriat AM, Muller U, Harry JL, Uwanogho D, Sharpe PT. **PCR amplification of SRY-related gene sequences reveals evolutionary conservation of the SRY-box motif.** *PCR methods and applications* 1993; 2(3):218-222.
74. Reifsnnyder C, Jouvenot, Y. **Leistungsstarke Kombination von Real-Time- und digitaler PCR.** In; 2015.
75. Groth J. **Meine Moleküle. Deine Moleküle. Von der molekularen Individualität.** In; 2009.
76. Bateson W. **Mendel's Principles of Heredity. A Defence.** In. 1 ed. London: Cambridge University Press; 1902.
77. Mullis K. In.
78. Lottspeich F, Engels JW. **Bioanalytik.** 2 ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2006.
79. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. **Real time quantitative PCR.** *Genome research* 1996; 6(10):986-994.
80. Byrne P, Huang W, Wallace VM, Shean MK, Zhang Z, Zhong Q, et al. **Chimerism analysis in sex-mismatched murine transplantation using quantitative real-time PCR.** *BioTechniques* 2002; 32(2):279-280, 282-274, 286.
81. Stahl T, Bohme MU, Kroger N, Fehse B. **Digital PCR to assess hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation.** *Experimental hematology* 2015; 43(6):462-468 e461.
82. McCann SR, Crampe M, Molloy K, Lawler M. **Hemopoietic chimerism following stem cell transplantation.** *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis* 2005; 32(1):55-61.
83. Bornhauser M, Oelschlaegel U, Platzbecker U, Bug G, Lutterbeck K, Kiehl MG, et al. **Monitoring of donor chimerism in sorted CD34+ peripheral blood cells allows the sensitive detection of imminent relapse after allogeneic stem cell transplantation.** *Haematologica* 2009; 94(11):1613-1617.
84. Andreani M, Testi M, Lucarelli G. **Mixed chimerism in haemoglobinopathies: from risk of graft rejection to immune tolerance.** *Tissue antigens* 2014; 83(3):137-146.



85. Taira C, Matsuda K, Yamaguchi A, Uehara M, Sugano M, Okumura N, et al. **Rapid single nucleotide polymorphism based method for hematopoietic chimerism analysis and monitoring using high-speed droplet allele-specific PCR and allele-specific quantitative PCR.** *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2015; 445:101-106.
86. Liesveld JL, Rothberg PG. **Mixed chimerism in SCT: conflict or peaceful coexistence?** *Bone marrow transplantation* 2008; 42(5):297-310.
87. Odriozola A, Riancho JA, Colorado M, Zarrabeitia MT. **Evaluation of the sensitivity of two recently developed STR multiplexes for the analysis of chimerism after haematopoietic stem cell transplantation.** *International journal of immunogenetics* 2013; 40(2):88-92.
88. Bacher U, Haferlach T, Fehse B, Schnittger S, Kroger N. **Minimal residual disease diagnostics and chimerism in the post-transplant period in acute myeloid leukemia.** *TheScientificWorldJournal* 2011; 11:310-319.
89. Dominiotto A. **Minimal residual disease markers before and after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia.** *Curr Opin Hematol* 2011; 18(6):381-387.
90. H. Robert Horton LAM, K. Gray Scrimgeour, J. David Rawn, Marc D. Perry. **Biochemie.** 2008.
91. Renneberg R. **Biotechnologie für Einsteiger.** 2 ed. München: Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier; 2007.
92. Quintrell N, Lebo R, Varmus H, Bishop JM, Pettenati MJ, Le Beau MM, et al. **Identification of a human gene (HCK) that encodes a protein-tyrosine kinase and is expressed in hemopoietic cells.** *Mol Cell Biol* 1987; 7(6):2267-2275.
93. Heuser H. **Lehrbuch der Analysis.** Stuttgart: Teubner; 1990.
94. Lion T, Watzinger F, Preuner S, Kreyenberg H, Tilanus M, de Weger R, et al. **The EuroChimerism concept for a standardized approach to chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation.** *Leukemia* 2012; 26(8):1821-1828.
95. Guz K, Nasilowska B, Tomaszewska A, Orzinska A, Smolarczyk-Wodzinska J, Krzemienowska M, et al. **Real-Time PCR Analysis of Chimerism in T Cell Subsets as an Early Predictor of Graft-Versus-Host Disease Following Allogeneic Stem Cell Transplantation.** *Annals of transplantation* 2015; 20:720-728.

96. Willasch AM, Kreyenberg H, Shayegi N, Rettinger E, Meyer V, Zabel M, et al. **Monitoring of hematopoietic chimerism after transplantation for pediatric myelodysplastic syndrome: real-time or conventional short tandem repeat PCR in peripheral blood or bone marrow?** *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2014; 20(12):1918-1925.
97. Thiede C MR, Bader B. **Chimärismusanalysen.** In: *Hämatopoetische Stammzellen - Grundlagen und klinische Einsatzgebiete.* Köln: Deutscher Ärzte Verlag; 2015. pp. 157-161.
98. Wiedemann B, Klyuchnikov E, Kroger N, Zabelina T, Stahl T, Zeschke S, et al. **Chimerism studies with quantitative real-time PCR in stem cell recipients with acute myeloid leukemia.** *Experimental hematology* 2010; 38(12):1261-1271.

## **Danksagung**

Ich möchte mich hiermit bei Prof. Dr. med. H. Einsele, Direktor der medizinischen Klinik und Poliklinik II, für die Möglichkeit bedanken, diese Doktorarbeit in seiner Klinik durchführen zu können.

Ein großer Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler, der mir das Thema dieser Doktorarbeit zur Verfügung gestellt hat, die Arbeit hervorragend betreut und mir immer mit aufbauenden Worten geduldig zur Seite gestanden hat.

Prof. Dr. med. Matthias Eyrich möchte ich für die Bereitstellung der Geräte im Labor der Kinderklinik und seine Beratung danken.

Ein großer Dank gilt der ganzen Arbeitsgruppe der AG Löffler, die mich herzlich aufgenommen haben und mir bei fachlichen Fragen und auch in den Pausen immer zur Seite standen.

Ein ganz besonderer Dank gilt hier Nadine Wilhelm, die mich durch weite Teile der Arbeit an der Hood begleitet hat.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Rump, Prof. Dr. med. Sellin und Dr. med. Eva Königshausen, die mich motiviert haben, diese Arbeit fertig zu stellen.

Abschließend möchte ich meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden einen besonderen Dank aussprechen, da sie immer für mich da waren und mich unterstützt haben. Mit ihrer Liebe, Geduld und Hartnäckigkeit waren sie zu einem wesentlichen Teil am Abschluss dieser Arbeit beteiligt.