

**Aus der Klinik und Poliklinik II  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele**

**Etablierung und Evaluierung eines molekularen Nachweises zur  
Quantifizierung des Chimärismus nach allogener  
Stammzelltransplantation**

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

**Vorgelegt von  
Sebastian Kind  
aus Landshut**

**Würzburg, Juni 2020**

**Referent** : apl. Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler  
**Korreferent** : Univ.-Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald  
i.V. Frau PD Dr. C. Monoranu  
**Dekan** : Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung : 19.06.2020**

**Der Promovend ist Arzt**

*Für meine Eltern, die es mir stets ermöglicht haben, meine Träume zu verwirklichen und meinen Bruder, der dafür sorgt, dass mir diese nie ausgehen.*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>3</b>
1.1. Allogene Stammzelltransplantation.....	3
1.1.1. Geschichte der allogenen Stammzelltransplantation .....	3
1.1.2. Aktuelle Entwicklung .....	4
1.1.3. Durchführung einer allogenen Stammzelltransplantation.....	5
1.2. Chimärismus.....	8
1.2.1. Definition des Chimärismus .....	8
1.2.2. Unterschiedliche Chimärismusuntersuchungen.....	8
1.3. RT-PCR .....	11
1.4. Fragestellung .....	14
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
2.1. Material .....	15
2.1.1. Geräte.....	15
2.1.2. Verbrauchsmaterialien .....	16
2.1.2.1. Labormaterialien .....	16
2.1.2.2. Assays und Kits .....	16
2.1.2.3. Reagenzien, Lösungen und Puffer.....	16
2.1.2.4. Antikörper.....	17
2.1.2.5. Primer .....	18
2.1.2.6. Sonden .....	19
2.2. Methoden.....	20
2.2.1. DNA-Isolation aus humanen Leukozyten.....	20
2.2.2. Verbesserung der DNA-Isolation .....	21
2.2.3. Allelnachweis mittels SYBR-Green .....	21
2.2.4. Gelelektrophorese der Amplifikate.....	22

2.2.5. Herstellung der Verdünnungsreihe .....	23
2.2.6. RT-PCR der Verdünnungsreihen.....	25
2.2.7. Berechnung der Standardkurven .....	26
2.2.8. Die Chimärismusuntersuchung in der Routine.....	27
2.2.9. CD3 <sup>+</sup> -Isolation mit PBMCs.....	27
2.2.10. Zellfärbung und FACS .....	28
2.2.11. Herstellung eines künstlichen CD3 <sup>+</sup> -Chimärismus.....	28
2.2.12. Routineuntersuchung des CD3 <sup>+</sup> -Chimärismus .....	29
2.2.13. Berechnung des CD3 <sup>+</sup> -Chimärismus .....	30
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
3.1. Anpassung der Methoden an die Chimärismusuntersuchung.....	31
3.2. Ergebnisse der Standardkurven .....	32
3.3. Verlässlichkeit der Methode.....	33
3.4. Ergebnisse der Routineuntersuchung.....	37
3.5. Ringversuche.....	40
3.6. Aufbau des CD3 <sup>+</sup> -Chimärismus .....	42
3.7. Ergebnisse der Routineuntersuchung des CD3 <sup>+</sup> -Chimärismus .....	46
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>48</b>
4.1. Resümee der Chimärismusuntersuchung.....	48
4.2. Möglichkeiten zur Verbesserung der Routineuntersuchung.....	51
4.3. Vergleich zwischen quantitativer RT-PCR und STR/VNTR .....	53
4.4. MRD Diagnostik und neue Untersuchungsmethoden .....	56
4.5. Kritische Betrachtung der T-Zell-Chimärismus-Untersuchung .....	58
4.6. Weitere Anwendungsmöglichkeiten der quantitativen RT-PCR .....	62
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>64</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>65</b>

## 1. Einleitung

### 1.1. Allogene Stammzelltransplantation

#### 1.1.1. *Geschichte der allogenen Stammzelltransplantation*

Die erste erfolgreiche Stammzelltransplantation wurde im Jahr 1956 durch Edward D. Thomas, der auch als Wegbereiter dieser gilt, durchgeführt. Als Patienten diente hierbei ein Zwillingsspaar, von denen der Empfänger an Leukämie erkrankt war. Darüber hinaus wurden von Thomas noch fünf weitere Patienten behandelt, wobei lediglich bei einem Rezipienten die Zellen des Spenders nachgewiesen werden konnten. Im Verlauf sind jedoch alle Patienten noch vor dem hundertsten Tag nach Transplantation verstorben. Auch Transplantationen, die zu dieser Zeit an anderen Häusern durchgeführt wurden, schlugen aufgrund des fehlenden Wissens um die Histokompatibilität fehl.<sup>[1, 2]</sup>

Durch weitere Forschung an Hundemodellen konnte Thomas nachweisen, dass das MHC-Matching unabdingbar für eine erfolgreiche Transplantation ist. Mit diesem Wissen gelang es ihm, Mitte der 60er Jahre bei einem Großteil der Versuchstiere ein Langzeitüberleben nach Bestrahlung, Transplantation und kurzzeitiger Immunsuppression zu erreichen. Zur selben Zeit wurden andernorts erste Methoden zur HLA-Typisierung entwickelt.<sup>[1]</sup>

1969 nahm Thomas wieder klinische Versuche auf, in denen er Patienten mit Zellen von HLA-kompatiblen Geschwistern transplantierte. Mit dieser neuen Vorgehensweise war es zum ersten Mal möglich, eine komplette Remission zu erreichen. Durch die weitere Verbesserung der Methodik konnten bereits 1979 mehr als die Hälfte aller AML-Patienten geheilt werden, die eine Remission erreicht haben.<sup>[1, 2]</sup>

Ein weiterer Durchbruch gelang 1980, als zum ersten Mal eine Transplantation mit einem nicht verwandten Spender erfolgreich durchgeführt wurde. Somit konnte einem größeren Patientenkollektiv geholfen werden. Hinzu kamen weitere Fortschritte im Bereich der Immunsuppression, mit denen die GvHD (Graft versus Host Disease) besser behandelt werden konnte.<sup>[1]</sup>

Ohne diese wichtige Vorarbeit wäre der große Erfolg der allogenen Stammzelltransplantation heutzutage undenkbar.

### 1.1.2. Aktuelle Entwicklung

Während der letzten 70 Jahre ist aus dieser ursprünglich sehr experimentellen Therapieform ein immer wichtigeres Standbein der Medizin geworden, die bei der Behandlung unterschiedlichster Erkrankungen angewandt wird.

Im Jahr 2014 wurden allein in Europa an 36.469 Patienten (15.765 allogene und 20.704 autologe) insgesamt 40.829 Stammzelltransplantationen durchgeführt.<sup>[3]</sup>

Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Gesamtzahl an Transplantationen während der letzten Jahre kontinuierlich angestiegen ist. Ein Grund hierfür liegt in der stetig zunehmenden Transplantationsrate, was vor allem in Osteuropa zu beobachten ist.<sup>[3]</sup>

Zusätzlich wird die allogene Stammzelltransplantation zur Behandlung von immer mehr Erkrankungen angewandt. So nutzt man sie nicht mehr nur bei malignen hämatologischen Erkrankungen, sondern auch bei nonmalignen Erkrankungen der Blutbildung oder des Immunsystems (siehe Tabelle 1).<sup>[3]</sup>

<b>Maligne Erkrankungen</b>	ALL, AML, CLL, CML, Hodgkin Lymphom, Juvenile CML, MM, MDS, Myeloproliferative Erkrankungen, Non-Hodgkin Lymphome
<b>Nonmaligne Erkrankungen</b>	Angeborene Metabolismus Erkrankungen, Aplastische Anämie, Blackfan-Diamond Anämie, Fanconi Anämie, Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie, schwere kombinierte Immundefekte, Sichelzellanämie, Thalassämie, Wiskott-Aldrich Syndrom

Tabelle 1: Indikationen zur Durchführung einer allogenen Stammzelltransplantation<sup>[2]</sup>

Dennoch werden immer noch mehr als 2/3 aller allogenen Stammzelltransplantationen aufgrund von Leukämien oder Lymphomen durchgeführt (siehe Abbildung 1).<sup>[3]</sup>

Im Hinblick auf das Spendermaterial ist zu beobachten, dass der Anteil an haploidenten Spendern und Fremd Spendern ansteigt.<sup>[3]</sup>

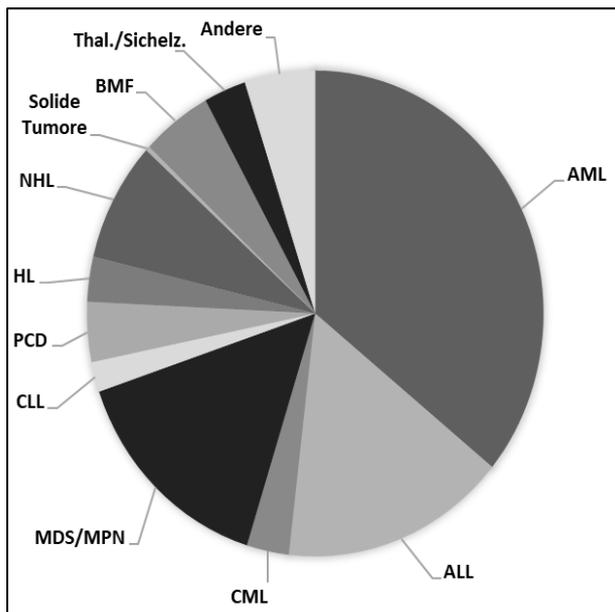


Abbildung 1: Prozentuale Aufteilung der Indikationen für eine allogene Stammzelltransplantation.<sup>[3]</sup>

AML: Akute myeloische Leukämie  
 ALL: Akute lymphatische Leukämie  
 CML: Chron. myeloische Leukämie  
 MDS: Myelodysplastisches Syndrom  
 CLL: Chron. lymphatische Leukämie  
 PCD: Plasma Cell Disorders  
 HL: Hodgkin Lymphom  
 NHL: Non-Hodgkin Lymphom  
 BMF: Bone Marrow Failure

### 1.1.3. Durchführung einer allogenen Stammzelltransplantation

Am Anfang einer jeden allogenen Stammzelltransplantation steht die Suche nach einem passenden Spender. Dies geschieht mit Hilfe des HLA-Systems, wobei eine Typisierung von HLA-A, -B, -C, DRB<sub>1</sub>, DQB<sub>1</sub> durchgeführt wird.<sup>[4]</sup> Als kompatibler Spender wird im Regelfall der angesehen, bei dem diese Oberflächenstrukturen mit denen des Patienten übereinstimmen (10/10 Match).<sup>[4, 5]</sup> Bei 25-30% der Patienten kann auf diese Weise ein Spender innerhalb der Familie gefunden werden.<sup>[4]</sup> Für den Fall, dass für einen Patienten kein passender Spender gefunden wird, bzw. es der gesundheitliche Zustand des Patienten nicht zulässt, länger zu suchen, können auch Stammzellen eines HLA-haploidenten Spenders verwendet werden.<sup>[4-6]</sup>

Nachdem der passende Zeitpunkt im Rahmen des Therapieregime gewählt wurde, beginnt man mit der Konditionierung mit dem Ziel, sowohl die Krebszellen abzutöten als auch das Immunsystem so stark zu supprimieren, damit ein Engraftment der fremden Stammzellen möglich ist.<sup>[2]</sup> Um die Gefahr einer Abstoßung des Transplantats zu minimieren, wird neben der Konditionierung noch zusätzlich eine Immunsuppression durchgeführt, um die Aktivität der verbleibenden T-Zellen weiter zu reduzieren.<sup>[4]</sup> Die Zerstörung der Tumorzellen hat eine Freisetzung großer Mengen an Antigenen zur Folge, was

im weiteren Verlauf zu einer verstärkten T-Zell Antwort der Spenderzellen und einer besseren Bekämpfung des Resttumorgewebes führt.<sup>[2, 7]</sup>

Im Anschluss an die Konditionierung werden dem Patienten die Stammzellen appliziert. Ursprünglich wurden diese gewonnen, indem das Os Ilium des Spenders punktiert wurde und das Knochenmark entnommen wurde, aus dem die Stammzellen isoliert werden konnten.<sup>[2]</sup> Seit einigen Jahren werden die Stammzellen mittels Leukapherese, einer deutlich weniger invasiven Methode, gewonnen. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass CD34<sup>+</sup>-Zellen regulär 0,06% aller Leukozyten im peripheren Blut ausmachen.<sup>[2]</sup> Der Anteil wird durch die Applikation von Wachstumsfaktoren (G-CSF) erhöht, sodass es zu einer zusätzlichen Ausschwemmung der CD34<sup>+</sup>-Zellen aus dem Knochenmark kommt, was die Isolation vereinfacht.<sup>[8, 9]</sup>

In Zusammenhang mit der Transplantation kann es bei den Patienten zu verschiedenen Komplikationen kommen. Die wichtigste stellt die Graft versus Host Disease (GvHD) dar, die bei ca. jedem zweiten Patienten auftritt.<sup>[2]</sup> Sie wird in eine akute und eine chronische Form unterteilt.<sup>[2]</sup> In der akuten Form kommt es zu einer Immunreaktion des körperfremden Immunsystems, die gegen den Empfänger selbst gerichtet ist.<sup>[10]</sup> Ursächlich hierfür ist ein komplexes Zusammenspiel aus angeborenem und erworbenem Immunsystem, in dem die Spender-T-Zellen eine Schlüsselrolle einnehmen und es letztlich auch zytotoxische T-Zellen sind, die den Patienten angreifen.<sup>[2, 10]</sup> Vor allem werden hierbei die Haut, die Leber und die Verdauungsorgane beschädigt.<sup>[2]</sup> Die Behandlung besteht hauptsächlich in einer Immunsuppression mittels Corticosteroiden.<sup>[2]</sup> Eine weitere Möglichkeit, gegen die akute GvHD vorzugehen, besteht in der Prävention mittels Immunsuppression, ohne die eine akute GvHD trotz 10/10 Match bei nahezu jedem Patienten auftreten würde.<sup>[2, 5, 8]</sup> Zusätzlich kann eine T-Zell-Depletion der Stammzellen, die mittels Leukapherese gewonnen wurden, durchgeführt werden, da diese einen sehr hohen Gehalt an T-Zellen haben.<sup>[2]</sup> Das klinische Erscheinungsbild der chronischen GvHD gleicht eher dem einer Autoimmunerkrankung (e.g. systemischer Lupus erythematodes) als dem Bild der akuten GVHD.<sup>[11]</sup> So umfassen die Beschwerden unter anderem Malabsorptionsstörungen,

Keratokonjunktivitis sicca, Anämie oder eine generelle Immunschwäche.<sup>[2]</sup> Die Behandlung besteht jedoch ebenfalls in einer Corticosteroidgabe.<sup>[2]</sup> Abgesehen von der GvHD gibt es noch viele andere Nebenwirkungen, die im Rahmen einer allogenen Stammzelltransplantation auftreten können, wie beispielsweise die Mucositis oder auch Infektionen, welche nicht selten lebensbedrohlich ablaufen können.<sup>[2]</sup>

Trotz all dieser möglichen Nebenwirkungen überwiegt immer noch der Nutzen dieser aggressiven Therapieform, da mit ihr eine komplette Remission erreichen kann. Dies geschieht einerseits durch die sehr starke Chemotherapie, mit der die Resistenz einzelner Tumorzellen durchbrochen werden kann, was mit einer normalen Chemotherapiedosis nicht möglich wäre.<sup>[4]</sup> Andererseits kommt es bei der allogenen Stammzelltransplantation auch zu einer Graft versus Leukemia (GvL), oder auch Graft versus Tumor Reaktion.<sup>[2]</sup> Bei dieser greift das fremde Immunsystem, ähnlich der GvHD, Gewebe des Patienten an. Jedoch werden keine gesunden Zellen bekämpft, sondern der Tumor selbst.<sup>[4]</sup> Ein Zusammenhang zwischen diesen Reaktionen ist daran ersichtlich, dass eine signifikant niedrigere Rezidivrate bei Patienten mit akuter/chronischer GvHD nachgewiesen werden konnte.<sup>[4]</sup> Zusätzlich wurde erkannt, dass die Rezidivrate bei Patienten höher war, die T-Zell depletierte Stammzellen erhalten haben.<sup>[4, 12]</sup> Der Grund hierfür liegt wie oben beschrieben in der wichtigen Rolle, die die T-Zellen bei der GvHD-Reaktion einnehmen.<sup>[4, 12]</sup>

## 1.2. Chimärismus

### 1.2.1. Definition des Chimärismus

In der griechischen Mythologie wird eine Chimära klassischerweise als Mischwesen, bestehend aus einem Löwen, einer Ziege und einer Schlange bzw. einem Drachen, beschrieben.<sup>[13]</sup>

Heutzutage werden in der Wissenschaft Lebewesen als Chimäre bezeichnet, die fremde Zellen oder Organe in sich tragen.<sup>[14]</sup> Der Begriff Chimärismus ist definiert als die Koexistenz von Zellen in einem Organismus, die aus zwei oder mehr Zygoten entstanden sind.<sup>[15]</sup>

Somit besteht bei Patienten nach einer allogenen Stammzelltransplantation ein Chimärismus. Das Verhältnis von Spender- zu Empfängerzellen bestimmt das Stadium, in dem sich der Patient befindet. Die einzelnen Chimärismusstadien sind in Tabelle 2 aufgelistet.

<b>Kompletter Chimärismus</b>	100% Donor-Zellen
<b>Gemischter Chimärismus</b>	5-90% Donor-Zellen
<b>Split Chimärismus</b>	Eine oder mehrere Zelllinien sind Donor-Zellen und eine oder mehrere Zelllinien sind Empfänger-Zellen
<b>Mikrochimärismus</b>	<1% an Empfänger Zellen sind nachweisbar

Tabelle 2: Auflistung der Chimärismusstadien<sup>[15]</sup>

### 1.2.2. Unterschiedliche Chimärismusuntersuchungen

Um frühzeitig potenziell gefährliche Situationen im Anschluss an eine allogene Stammzelltransplantation zu erkennen, ist es nötig, sowohl den genauen Chimärismusgrad als auch den Chimärismusverlauf zu kennen. Zu diesem Zweck wurden diverse Methoden entwickelt, die in Tabelle 3 aufgelistet sind.<sup>[15]</sup>  
<sup>16]</sup> Das Grundprinzip all dieser Untersuchungen besteht darin, unterschiedliche genetische Polymorphismen oder Genprodukte nachzuweisen.<sup>[15]</sup>

Technik	Vorteil	Nachteil	Sensitivität	Information
<b>Amelogenin</b>	Unterscheidung des Amelogenin-Gens, das auf Chromosom X (AMELX) und Chromosom Y (AMELY) liegt, mittels PCR.			
	Kann mit männ. oder weibl. Donor verwendet werden. Hoch informativ.	Spender und Empfänger müssen unterschiedliches Geschlecht haben. Oft Falsch-Positiv.	0,1-4%	Hoch
<b>Zytogenetik</b>	Untersuchung polymorpher Genregionen oder Mutationen während der Metaphase der Zellteilung.			
	Sehr gut bei CML zum Monitoring von Ph-positiven Zellen.	Evaluiert nur teilende Zellen. Oft Falsch-Positiv. Nicht sehr sensitiv. Proben-/Zeitintensiv	5-10%	Niedrig
<b>Erythrozyten Phänotypisierung</b>	Unterscheidung der unterschiedlichen Phänotypen mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie.			
	Einfach und genau. Hohe Sensitivität. Sehr gut bei CML.	Bluttransfusionen wirken verfälschend. Nur ein Zelltyp wird untersucht.	0,04-3%	Niedrig
<b>FISH (Fluorescent in situ hybridization)</b>	Weiterentwicklung der zytogenetischen Untersuchung mittels Probenanfärbung. Im Vergleich geringerer Arbeits- und Probenaufwand.			
	Untersucht hohe Zellzahl. Hohe Sensitivität. Selten Falsch-Positiv.	Benötigt viel Material	0,7-5%	Hoch
<b>RFLP (Restriction fragment length polymorphism)</b>	Unterscheidung durch An- oder Abwesenheit von Ansatzpunkten für Restriktionsenzyme (e.g. EcoRI, BamHI) mittels Elektrophorese oder Southern Blot.			
	Evaluiert alle Zellen mit Zellkern. Hoch informativ	Niedrige Sensitivität	5-10%	Hoch
<b>RT-PCR</b>	Siehe unten			
	Schnell und exakt. Sensitivste Methode	Teuer. Meist benötigt man zwei Allele.	0,1-1%	Hoch

Technik	Vorteil	Nachteil	Sensitivität	Information
STR/VNTR	Siehe unten			
	Polymorphe Regionen. Hoch informativ.	Niedrige Sensitivität, da beide Zellpopulationen dieselben Primer verwenden.	0,4-5%	Sehr hoch
Y- / X-Chromosomen Marker	Ähnlich Amelogeninmethode. Es werden spezifische Regionen des Y- (e.g. Y-STR) bzw. X- (e.g. HUMARA) Chromosoms mittels PCR untersucht.			
	Hoch informativ	Nur anwendbar, wenn Spender und Empfänger ein unterschiedliches Geschlecht haben	0,1-4%	Hoch

Tabelle 3: Überblick und Vergleich der unterschiedlichen Chimärismusuntersuchungen<sup>[14; 16]</sup>

Unter all diesen Untersuchungen sind besonders die STR/VNTR und die quantitative RT-PCR hervorzuheben.

Bei der STR/VNTR werden mittels PCR repetitive, hoch polymorphe Genregionen untersucht.<sup>[15]</sup> Umfasst eine repetitive Sequenz 15-50 Nukleotide, so wird sie als VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) oder Minisatellit bezeichnet.<sup>[15]</sup> Ist sie nur 2-6 Nukleotide lang, nennt man sie STR (Short Tandem Repeats) oder Mikrosatellit.<sup>[15]</sup> Lange Zeit galt dieses Verfahren als die sensitivste und informativste Methode und war somit der Goldstandard der Chimärismusuntersuchungen.<sup>[15, 17]</sup>

Mit der quantitativen RT-PCR ist eine ebenfalls sehr sensitive Praktik eingeführt worden, die laut Alizadeh et al. die beste Methode ist um einen Mikrochimärismus nachzuweisen.<sup>[15, 17]</sup> Bei dem Verfahren werden Fluoreszenzsignale während der eigentlichen PCR gemessen, die von Sonden emittiert werden, die an bestimmten Gensequenzen binden.<sup>[15]</sup>

Diese Arbeit beschäftigt sich vor allem mit der quantitativen RT-PCR. Das Verfahren wird anschließend unter Punkt 2 näher erläutert.

### 1.3. RT-PCR

Mit der Erfindung der Polymerase Kettenreaktion, kurz PCR, war es erstmals möglich, in kürzester Zeit große Mengen an DNA-Abschnitten zu synthetisieren und nachzuweisen.<sup>[18]</sup> Sie nimmt heutzutage eine wichtige Rolle in der alltäglichen Diagnostik vieler Krankenhäuser ein.<sup>[19]</sup> So können mit ihrer Hilfe schnell und präzise sowohl Krankheitserreger als auch genetische Mutationen nachgewiesen werden.<sup>[19]</sup> Gerade Letzteres wird in der Zeit, in der die personalisierte Medizin einen immer höheren Stellenwert einnimmt, immer wichtiger.<sup>[19]</sup>

Als Polymerase dient zumeist die thermostabile DNA-Polymerase von *thermus aquaticus*, die zudem eine 5'3' Exonuklease Aktivität aufweist.<sup>[20]</sup> Neben dieser benötigt man für eine PCR Nukleotide, welche als Grundbausteine für den neuen DNA-Strang fungieren und sogenannte Primer.<sup>[18]</sup> Dies sind kurze, komplementäre DNA-Abschnitte, die als Startpunkt der Polymerase dienen und gleichzeitig den zu amplifizierenden Genabschnitt eingrenzen.<sup>[18]</sup>

Der Ablauf einer PCR geschieht in Zyklen. Zunächst wird die zu amplifizierende DNA über ihren Schmelzpunkt erhitzt, sodass Einzelstränge entstehen.<sup>[18]</sup> Daraufhin wird die Temperatur soweit abgesenkt, dass sich die Primer mit den Einzelsträngen verbinden können; dieser Prozess wird als Annealing bezeichnet.<sup>[18]</sup> Nach diesem Schritt wird die Temperatur wieder erhöht, sodass die Polymerase beginnen kann, komplementäre DNA-Stränge zu erstellen.<sup>[18]</sup> Nachdem die DNA-Abschnitte fertig synthetisiert wurden, beginnt der Zyklus von vorne und die Proben werden abermals erhitzt. Da sich nach jedem Zyklus doppelt so viele DNA-Abschnitte in der Probe befinden, ergibt sich ein exponentielles Wachstum.

Nach der PCR können die Produkte beispielsweise mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Sichtbar gemacht werden diese entweder durch ein chemisches Färbemittel, z.B. Ethidiumbromid, oder vorbehandelte Primer, welche fluoreszieren.<sup>[18]</sup>

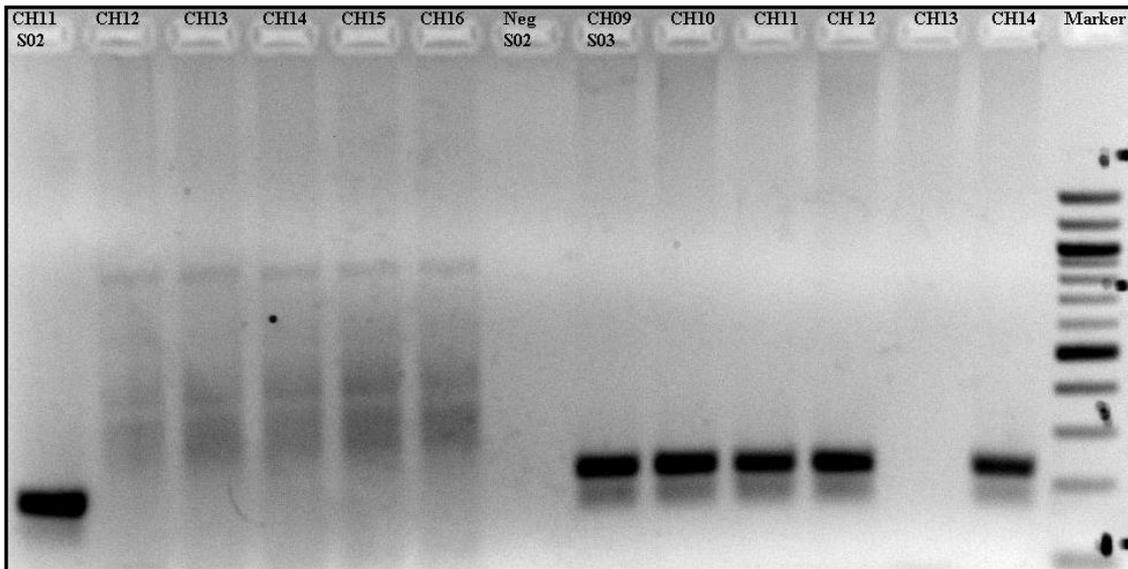


Bild 1:  
Gelelektrophorese von S02 mit den Proben CH11-CH16 und einer Negativprobe (Neg) und S03 mit den Proben CH09-CH14. Deutlich positive Banden bei dem Nachweis des Allels S02 in CH11 und des Allels S03 in den Proben CH09-CH12 und CH14.

Mit dieser Art der Untersuchung kann jedoch nur die An- bzw. Abwesenheit eines Genabschnittes nachgewiesen werden; sie wird daher auch als qualitative PCR bezeichnet.<sup>[18]</sup>

Im Gegensatz hierzu bietet die quantitative real time PCR die Möglichkeit, die Menge der DNA während der Untersuchung festzustellen.<sup>[18, 21]</sup> Dies geschieht entweder mittels fluoreszierender Stoffe, welche sich unspezifisch an Doppelstrang-DNA binden und dabei ein messbares Signal emittieren (z.B. SYBR-Green®), oder mittels spezifischer DNA-Proben, welche sich mit bestimmten Genabschnitten verbinden.<sup>[18]</sup> Bei letzteren wird durch einen Quencher verhindert, dass der Reporter messbare Signale emittiert.<sup>[22]</sup> Hierfür müssen sich jedoch beide in räumlicher Nähe zueinander befinden.<sup>[22]</sup> Nachdem sich die Probe mit der Ziel-DNA verbunden hat, wird diese durch die o.g. Exonukleaseaktivität der Polymerase abgebaut und das Signal des Reporters wird messbar (siehe Bild 2).<sup>[22]</sup>

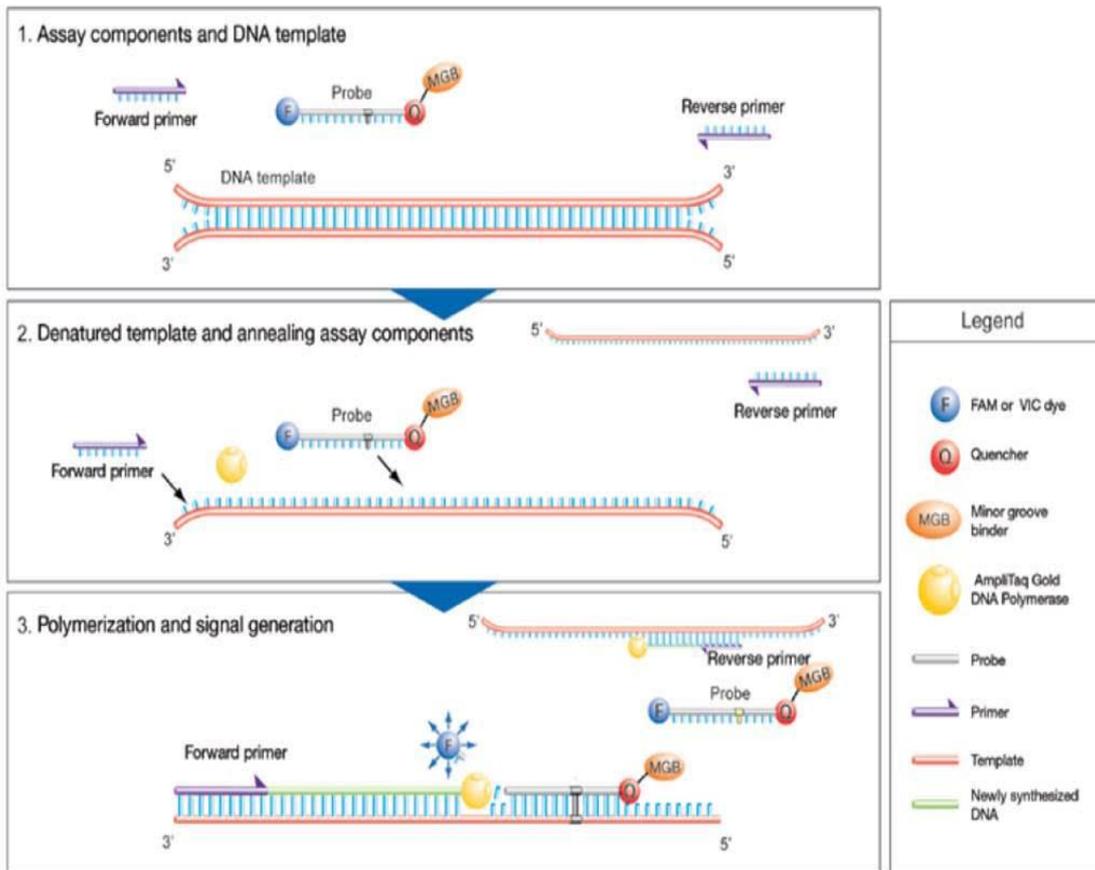


Abbildung 2: qRT-PCR. Schematische Darstellung der Freisetzung eines Signals im Laufe der Polymerisation.<sup>[22]</sup>

#### **1.4. Fragestellung**

Bereits seit dem Jahr 2005 werden am Universitätsklinikum Würzburg allogene Stammzelltransplantationen durchgeführt.<sup>[23]</sup> Aktuell werden bis zu 100 Patienten jährlich transplantiert.<sup>[23]</sup> Mit der stetig wachsenden Anzahl an Patienten, die Nachsorgeuntersuchungen und somit auch regelmäßige Chimärismusuntersuchungen benötigen, war es notwendig, eine sichere, schnelle und leicht in den Laboralltag zu integrierende Methode hierfür zu finden.

Wie in Punkt 1.2.2. beschrieben, standen viele verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Man entschloss sich letztlich dazu, das Verfahren mittels RT-PCR einzuführen, welches auf der Arbeit von Alizadeh et al. basiert.<sup>[17]</sup> Der Grund hierfür war sowohl die hohe Sensitivität, die mit dieser Untersuchung möglich ist, als auch die einfache Integration in die tägliche Routine, da nach Erstellung der Standardkurven nur zwei Arbeitsschritte (DNA-Isolierung, RT-PCR) bis zum Ergebnis vonnöten sind.

Die erste Fragestellung dieser Arbeit befasste sich somit mit der Etablierung dieser Methode. Weiter sollte in diesem Rahmen auch die Verlässlichkeit im Hinblick auf viele äußere Störfaktoren, welche im klinischen Alltag auftreten können, untersucht werden.

Ein weitere Fragestellung bezog sich auf den T-Zell-Chimärismus, da dieser große Auswirkungen auf den weiteren Verlauf der Erkrankung hat.<sup>[24, 25]</sup> So sollte letztlich noch untersucht werden, ob es mittels RT-PCR möglich ist, einen reinen T-Zell-Chimärismus zu untersuchen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

Gerät	Name/Bezeichnung	Hersteller
Gefrierschränke	KGK 2833 Comfort Herafreeze HFU3280HD	Liebherr Thermo
Gel Dokumentationssystem	Multimage Light Cabinet	Biozym
Gel-Kamera	Alpha Innotech	Biozym
Gel-Kammer	Horizon 11.14	Biometra
Heizblock	NeoBlock Heizer Mono I 2- 2503	NeoLab
MACS® Separator	QadroMACS™ Separator	Miltenyi Biotec
Mikroskope	Eclipse 50i	Nikon
Mikrowelle	MM41568	Micromaxx
Neubauer Haemozytometer	Neubauer Improved	HBG Henneberg- Sander
Pipetten	Eppendorf Refernce® (2,5µl, 10µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann
Präzisionswaage	GF-200	A&D Instruments
RT-PCR System	StepOnePlus™	Applied Biosystem
Spectrophotometer	NanoDrop1000	Peqlab
Sterilbank	HeraSafe HS15	Heraeus/Kendo
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Zentrifugen	Centrifuge 5415D/5415R Heraeus® Multifuge® 3SR Galaxy Mini	Eppendorf Thermo Scientific VWR

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Geräte

## 2.1.2. Verbrauchsmaterialien

### 2.1.2.1. Labormaterialien

Verbrauchsmaterial	Name/Bezeichnung	Hersteller
EDTA Monovette	1,6mg EDTA/ml Blut	Sarstedt
MACS® Cell Separation Columns	LS Column	Miltenyi Biotec
Klebefolie	Klebefolie, optisch klar	Sarstedt
Pipettenspitzen	10µl, 100µl, 1000µl	Biozym Diagnostik, Oldendorf
Tubes	BD Falcon™ Conical Tube (15ml, 50ml) FlipTube (0,2ml, 1,5ml, 2ml)	BD Bioscience Hartenstein, Würzburg
Well Platten	96 Fast PCR-Platten Halbrand	Sarstedt

Tabelle 5: Auflistung der Labormaterialien

### 2.1.2.2. Assays und Kits

Assay/Kit	Hersteller
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Quiagen, Hilden

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Assays

### 2.1.2.3. Reagenzien, Lösungen und Puffer

Reagenz/Lösung/Puffer	Details	Hersteller
Agarose Gel	Agarose NEE0	Roth Karlsruhe
Buffer EL	Erythrocyte lysis buffer 1000ml	Qiagen
DNA Leiter	25 bp	Invitrogen, Karlsruhe
DNA Leiter	100 bp	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol	96-100%	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	10 mg/ml	Sigma-Aldrich

Reagenz/Lösung/Puffer	Details	Hersteller
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid disodium salt solution for molecular biology 0,5M 100ml	Sigma-Aldrich
FCS	Fetal Bovine Serum 500ml	Sigma-Aldrich
Ficoll®	Biocoll Separations Lösung	Biochrom
Gel Ladepuffer	Konzentration: 10x	Invitrogen, Karlsruhe
HBSS	500ml With NAHCO <sub>3</sub> Without phenole red, CaCl <sub>2</sub> , MgSO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
MACS Separation Buffer	AutoMACS Running Buffer	Miltenyi Biotec
PCR Master Mix	iTaq™ Universal SYBR® Green supermix (2x) TaqMan® Gene Expression Master Mix TaqMan® Universal PCR Master Mix	Bio-Rad Applied Biosystems Applied Biosystems
TAE-Puffer	Konzentration: 10x	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Reagenzien, Lösungen und Puffer

#### 2.1.2.4. Antikörper

Antikörper	Details	Hersteller
IgG <sub>1</sub> PerCP	Mouse IgG <sub>1</sub> PerCP Clone X40 50µg/ml	BD Biosciences
CD3 Microbeads	Whole Blood CD3 Microbeads, human	Miltenyi Biotec
CD3 PerCP	CD3 PerCP Clone SK 7 12,5µg/ml	BD Biosciences

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Antikörper

### 2.1.2.5. Primer

Name	Genlokation	5' Primer 3'
S01a F	17q	GGTACCGGGTCTCCACATGA
S01R	17q	GGGAAAGTCACTCACCCAAGG
S01b F	17q	GTACCGGGTCTCCACCAGG
S02 F	Y	GCTTCTCTGGTTGGAGTCACG
S02 R	Y	GCTTGCTGGCGGACCCT
S03 F	6q	CTTTTGCTTTCTGTTTCTTAAGGGC
S03 R	6q	TCAATCTTTGGGCAGGTTGAA
S04a R	9	AAGGATGCGTGACTGCTATGG
S04 F	9	CTGGTGCCACAGTTACGCT
S04b R	9	AGGATGCGTGACTGCTCCTC
S05a F	20	AAAGTAGACACGGCCAGACTTAGG
S05 R	20	CATCCCCACATACGGAAAAGA
S05b F	20	AGTTAAAGTAGACACGGCCTCCC
S06 F	1p	CAGTACCCCGTGAAGTCCT
S06 R	1p	TTTCCCCCATCTGCCTATTG
S07a F	X	TGGTATTGGCTTTAAATACTGGG
S07a R	X	TGTACCCAAAACCTCAGCTGCA
S07b F	X	GGTATTGGCTTTAAATACTCAACC
S07b R	X	CAGCTGCAACAGTTATCAACGTT
S08a F	1q	CTGGATGCCTCACTGATCCA
S08 R	1q	TGGGAAGGATGCATATGATCTG
S08b F	1q	GCTGGATGCCTCACTGATGTT
S09a R	17q	TCAGCTTGTCTGCTTTCTGGAA
S09 F	17q	GGGCACCCGTGTGAGTTTT
S09b R	17q	CAGCTTGTCTGCTTTCTGCTG
S10a F	18	GCCACAAGAGACTCAG
S10 R	18	TGGCTTCCTTGAGGTGGAAT

Name	Genlokation	5' Primer 3'
S10b F	18	TTAGAGCCACAAGAGACAACCAG
S11a F	11	TAGGATTCAACCCTGGAAGC
S11 R	11	CCAGCATGCACCTGACTAACA
S11b F	11	CCCTGGATCGCCGTGAA
SR Y F	Y	AACTCACCTCCAACACATACTCCAC
SR Y R	Y	TTCATGATGAAATCTGCTTTTTGTTT
HCK F	20	TATTAGCACCATCCATAGGAGGCTT
HCK R	20	GTTAGGGAAAGTGGAGCGGAAG

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Primer

### 2.1.2.6. Sonden

Name	Genlokation	TaqMan (FAM-TAMRA) Sonde
S01	17q	CTGGGCCAGAATCTTGGTCCTCACA
S02	Y	CTGCACCACCAATCATCCCCGTG
S03	6q	CATACGTGCACAGGGTCCCCGAGT
S04	9	TCCTGGCAGTGTGGTCCCTTCAGAA
S05	20	CCCTGGACACTGAAAACAGGCAATCCT
S06	1p	CCCATCCATCTTCCCTACCAGACCAGG
S07	X	TCCTCACTTCTCCACCCCTAGTTAAACAG
S08	1q	CTCCAACCCCCATTTCTGCCTG
S09	17q	TGGAGGATTTCTCCCCTGCTTCAGACAG
S10	18	CAGTGTCCCACTCAAGTACTCCTTTGGA
S11	11	CAAGGCTTCTCAATTCTCCACCCTTCC
SR Y	Y	CAGCCACCAGAATTATCTCCAAGCTCTCTGA

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten FAM-TAMRA Sonden

Name	Genlokation	TaqMan (JOE-TAMRA) Sonde
HCK	20	TAACGCGTCCACCAAGGATGCGAA

Tabelle 11: Auflistung der verwendeten JOE-TAMRA Sonden

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. DNA-Isolation aus humanen Leukozyten

Die DNA-Isolation wurde mit Hilfe des QIAamp® DNA Blood Mini Kit der Firma Qiagen gemäß dem Spin Protocol durchgeführt, das die Aufreinigung von DNA aus Blut oder Körperflüssigkeiten beschreibt.

Als Ausgangsmaterial wird hierfür entweder 200µl EDTA-Blut, 200µl Buffycoat oder  $5 \times 10^6$  Lymphozyten in 200µl Pufferlösung benötigt.

Das Probenmaterial wurde anfangs zusammen mit 20µl Protease und 200µl AL-Puffer in ein 1,5 ml Eppendorf Tube® pipettiert und 15 Sekunden gevortext. Anschließend wurde die Probe für 10 Minuten bei 56°C in einem Heizblock inkubiert. Um sicherzustellen, dass sich stets sämtliche Anteile der Probe am Boden des Tubes sammeln, wurde eine kurze Zentrifugation jeweils vor und nach der Inkubationszeit durchgeführt. Nun wurden 200µl Ethanol (96-100%) hinzu pipettiert, die Probe wurde gevortext und abzentrifugiert.

Das gesamte Volumen wurde nun in eine beigelegte Filtersäule übertragen. Bei EDTA-Blut folgte nun eine einminütige Zentrifugation bei 6000g bzw. 8000rpm, bei Buffy Coat oder Lymphozyten wurde bei „full speed“ zentrifugiert. Die mit der DNA beladene Säule wurde in ein neues Tube gegeben und es wurden 500µl AW1-Puffer hinzugefügt. Unabhängig vom Probenmaterial wurde nun das Tube bei 6000g für eine Minute zentrifugiert. Der letzte Schritt wurde mit dem AW2 Puffer wiederholt. Die Zentrifugation wurde jedoch für 3 Minuten bei „full speed“ durchgeführt.

Nachdem die Säule in ein neues 1,5ml Eppendorf Tube® gegeben worden war, wurden 50-200µl AE-Puffer auf den Filter pipettiert und dieser wurde eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Die Säule wurde nun bei 6000g eine Minute zentrifugiert.

Der DNA-Gehalt des Eluates wurde nun mittels Photometrie bestimmt, wobei darauf zu achten war, dass die  $A_{260}/A_{280}$ -Ratio zwischen 1,7 und 1,9 zu liegen hatte. Sofern die DNA nicht direkt weiterverarbeitet wurde, wurde sie bei -20°C gelagert.

### **2.2.2. Verbesserung der DNA-Isolation**

Im Laufe der einzelnen DNA-Extraktionen hat sich herausgestellt, dass die DNA-Konzentration durch verschiedene Maßnahmen erhöht werden kann.

So wurde damit begonnen, bei EDTA-Blut einen doppelten Ansatz zu verwenden. Die beiden Proben wurden wie in Punkt 2.2.1. behandelt und wurden nacheinander auf dieselbe Filtersäule pipettiert. Zwischen den beiden Proben fand eine einminütige Zentrifugation bei 6000g statt.

Des Weiteren gingen wir dazu über, die Inkubationszeit des AE-Puffers von einer auf fünf Minuten zu erhöhen.

Außerdem zeigte sich, dass der DNA-Gehalt erhöhen werden konnte, indem das Eluat nach der letzten Zentrifugation nochmals auf den Filter gegeben wurde und bei 6000g für eine Minute zentrifugiert wurde.

### **2.2.3. Allelnachweis mittels SYBR-Green**

Um festzustellen, welche Allele ein Proband besitzt, wurde eine quantitative Real Time PCR mit Hilfe des StepOne Plus™ durchgeführt. Als DNA-Farbstoff wurde SYBR-Green verwendet.

Dieser bindet während des PCR Zyklus an doppelsträngige DNA und emittiert ein Fluoreszenzsignal. Da dieses proportional zur DNA-Menge zunimmt, kann eine Vervielfältigung des gesuchten Genabschnittes nachgewiesen werden.

Bei dem Nachweis wurde jeweils 1µl DNA, was einer DNA-Menge von 5pg bis 50ng entspricht, zu dem in Tabelle 12 gezeigten Mastermix gegeben.

Reagenzien	Volumen je 20µl Reaktion	Konzentration
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (2x)	10µl	1x
H <sub>2</sub> O	7µl	
Primer F (10µM)	1µl	500nM
Primer R (10µM)	1µl	500nM
Summe	19µl	

Tabelle 12: Zusammensetzung des Mastermix für die SYBR-Green PCR

Das Programm, mit dem die PCR durchgeführt wurde, ist in Tabelle 13 zu sehen.

Schritt		Dauer	Temperatur	Zyklen
Polymeraseaktivierung und DNA-Denaturierung		5 min.	95°C	1
Amplifikation	Denaturierung	15 sec.	95°C	32
	Annealing/Extension	60 sec.	60°C	
Schmelzkurvenanalyse		15 sec.	95°C	
		60 sec.	60°C + 0,5°C	
		15 sec.	95°C	

Tabelle 13: Programm für die SYBR-Green PCR

Anhand der Schmelzkurve konnte nun bestimmt werden, welcher Proband welchen Genabschnitt aufweist.

#### **2.2.4. Gelelektrophorese der Amplifikate**

Neben dem Allelnachweis mittels RT-PCR hat man sich zusätzlich dazu entschlossen, bei jeder Probe eine Gelelektrophorese durchzuführen. Bei unklaren Ergebnissen der RT-PCR konnte mit dieser sicher bestimmt werden, ob ein Proband einen Genabschnitt aufweist oder nicht.

Zunächst wurde 1g Agarose (Agarose NEEO) in 50ml TAE-Puffer aufgelöst. Nach dem Abwiegen wurde das Gemisch nun erhitzt, bis eine homogene Flüssigkeit entstanden ist. Hieraufhin wurde nochmals gewogen und der Verlust wurde mit Aqua destillata ersetzt. Nun wurden 3µl Ethidiumbromid hinzugefügt und das Gel wurde nach dem Mischen in die Form gegossen. Nach dem Aushärten wurde jede Tasche mit 10-15µl Probenmaterial gefüllt. Nachdem das Gel beladen war, wurde es nun für 45 Minuten unter 120 Volt Spannung gesetzt und anschließend ausgewertet.

Als Probenmaterial wurden die Amplifikate aus dem Versuch 2.2.3. verwendet. Hierbei wurden jeweils 20µl mit 3,3µl Farbstoff vermischt.

### **2.2.5. Herstellung der Verdünnungsreihe**

Für die Eichung der Chimärismus-Untersuchung war es unerlässlich, Verdünnungsreihen zwischen jeweils zwei Proben herzustellen, um einen künstlichen Chimärismus zu erzeugen.

Zu Beginn benötigte man vier 50ml Tubes, die jeweils mit 35ml „Buffer EL“ befüllt wurden. Nun wurden jedem Probanden 36ml EDTA-Blut entnommen, wovon jeweils 18ml in ein Tube gegeben wurde. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit im Kühlschrank wurden die Proben für 10 Minuten bei 300g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Leukozyten wurden vom Boden gelöst. Nun wurden in jeweils ein Tube eines Probanden 30ml „Buffer EL“ gegeben und dieses Gemisch wurde in das andere Tube desselben Probanden übertragen. Nach einer kurzen Inkubationszeit wurden die Proben abermals für 10 Minuten bei 300g und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Leukozyten vom Boden gelöst. Die nun isolierten Leukozyten wurden jeweils mit 15ml HBSS verdünnt.

Zur Berechnung der Gesamtleukozytenzahl je Probe wurden jeweils 10µl entnommen und mit 90µl HBSS verdünnt. Hiervon wurden noch einmal 10µl mit 10µl Tryptanblau vermischt. Eine Zählkammer wurde nun mit 10µl des Gemisches beladen und die Leukozyten wurden ausgezählt. Zur Fehlervermeidung und um ein möglichst genaues Ergebnis zu erhalten, wurde dieser Abschnitt samt Auszählung doppelt durchgeführt und ein Mittelwert gebildet. Zur Berechnung der Leukozytenzahl wurde folgende Formel verwendet:

$$L = m \times V \times 10^4 \times 20$$

L = Leukozytenzahl  
m = Mittelwert (Zellen/Zählquadrat)  
V = Volumen in ml

Nachdem die Zellzahl bekannt war, wurden die Leukozyten bei 300g und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert, der Überstand wurde abgegossen und die Leukozyten wurden vom Boden gelöst. In jedes Tube wurde nun das Volumen HBSS hinzugefügt, um jeweils auf eine Leukozytenkonzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen pro ml zu kommen.

Für die Verdünnungsreihe wurden zwölf 15ml Tubes wie folgt vorbereitet und beschriftet. In den Versuchen wurde dies doppelt angesetzt.

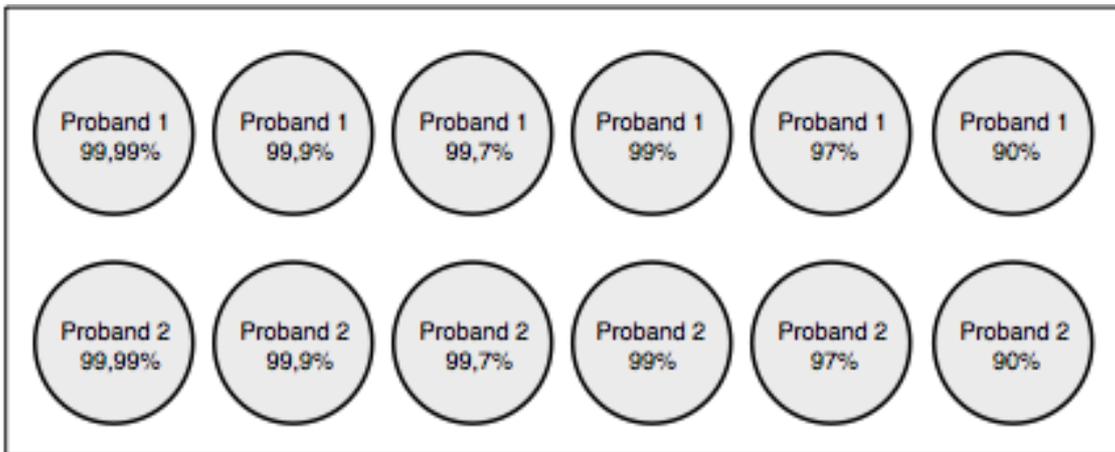


Abbildung 3: Veranschaulichung der Verdünnungsreihe. Es wurden jeweils die Volumina derselben Verdünnungen gemäß Tabelle 14 ausgetauscht. E.g. wurde je 1 ml von Proband 1 90% und Proband 2 90% untereinander ausgetauscht.

In jedem der Tubes wurden 1ml der jeweiligen Leukozytenlösung und 9ml HBSS vermischt.

Zur Herstellung des künstlichen Chimärismus wurden nun die jeweiligen Volumina aus den passenden Tubes gemäß Tabelle 14 ausgetauscht.

Verdünnung	Auszutauschendes Volumen
90%	1ml
97%	300µl
99%	100µl
99,7%	30µl
99,9%	10µl
99,99%	1µl

Tabelle 14: Auflistung der auszutauschenden Volumina in Abhängigkeit von der gewünschten Verdünnung. Die Volumina beziehen sich jeweils auf ein Gesamtvolumen von 10ml.

Die Tubes wurden ein letztes Mal in die Zentrifuge gegeben (500g; 10min; 4°C). Nachdem nun die Verdünnungsreihen fertig waren, wurden die Proben entweder für eine spätere Bearbeitung eingefroren oder die DNA-Extraktion wurde unmittelbar angeschlossen.

### **2.2.6. RT-PCR der Verdünnungsreihen**

Für die Durchführung sämtlicher RT-PCRs wurde der Applied Biosystems StepOnePlus™ verwendet.

Um eine möglichst hohe Genauigkeit der Ergebnisse zu erreichen, wurde in unseren Versuchen jede Probe jeweils dreimal auf die zu untersuchende Sonde und dreimal auf HCK geprüft. Da pro Verdünnungsstufe jeweils zwei Ansätze hergestellt wurden, gab es je Stufe 12 zu untersuchende Wells.

Jedes Well wurde gemäß Tabelle 15 beladen. Die zu untersuchende DNA-Menge wurde in Übereinstimmung mit dem Protokoll auf 100ng festgesetzt.<sup>[22]</sup> Da der DNA-Gehalt und somit auch das hinzugefügte Volumen je nach Probe variierte, musste zum Ausgleich die H<sub>2</sub>O Menge angeglichen werden, um ein Gesamtvolumen von 25µl zu erreichen.

Reagenzien	Volumen je 25µl Reaktion	Konzentration
TaqMan® Gene Expression Master Mix	12,5µl	
Primer R (10µM)	1µl	400nM
Primer F (10µM)	1µl	400nM
Sonde	1µl	200nM
DNA	xµl	100ng
H <sub>2</sub> O	9,5µl - xµl	
Summe	25µl	

Tabelle 15: Zusammensetzung des Mastermixes für die RT-PCR der Standardkurven

Nach Beladung der zu untersuchenden Wells und Verschluss der 96 Well Platten wurden diese vor der Untersuchung für einige Sekunden bei „Full Speed“ abzentrifugiert.

Die RT-PCR wurde mit dem Programm, das in Tabelle 16 zu sehen ist, durchgeführt.

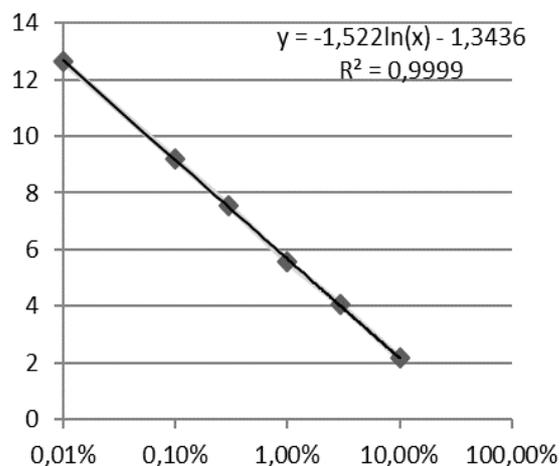
Schritt		Dauer	Temperatur	Zyklen
UDG Inkubation		2 min.	50°C	1
Enzymaktivierung		10 min.	95°C	1
Amplifikation	Denaturierung	15 sec.	95°C	50
	Annealing/Extension	60 sec.	60°C	

Tabelle 16: Programm der RT-PCR zur Untersuchung der Standardkurven

### 2.2.7. Berechnung der Standardkurven

Nach der Bestimmung der CT-Werte wurden die jeweiligen Mittelwerte der Proben gebildet und die  $\Delta$ CT-Werte berechnet. Diese wurden in einer logarithmischen Tabelle aufgetragen und es konnte somit die Steigung der Trendlinie samt  $R^2$  berechnet werden.

Für jede Sonde wurde jeweils ein CT-Wert und eine Formel festgelegt, mit Hilfe derer in den Routineuntersuchungen die genauen Verhältnisse zwischen Spender- und Empfängerzellen berechnet werden konnte.



### **2.2.8. Die Chimärismusuntersuchung in der Routine**

In der Routineuntersuchung wurden zunächst die Blutproben des Spenders und des Empfängers mittels der SYBR-Green-Methode (siehe 2.2.3.) auf das Vorhandensein der jeweiligen Genabschnitte untersucht. Da im Normalfall alle männlichen Patienten das SRY-Gen besitzen, weibliche Patientinnen jedoch nicht, konnte bei diesem Genabschnitt auf die SYBR-Green-Untersuchung verzichtet werden.

Nun wurden anhand dieser Daten für jedes Spender-Empfänger-Paar zwei bis drei Allele zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Hierbei war darauf zu achten, dass der Spender den ausgewählten Genabschnitt nicht aufweisen durfte, beim Empfänger hingegen musste er nachgewiesen worden sein.

Im Anschluss wurde eine RT-PCR durchgeführt. Die Zusammensetzung des Mastermixes und das Programm des StepOne™ Plus sind in Tabelle 15 und Tabelle 16 zu sehen. Bei der PCR wurden bei jedem Allel 5 Ansätze für den Primer und 3 Ansätze für das Housekeeping Gen (HCK) gemacht.

Die Ergebnisse wurden mit den festgelegten Thresholds versehen und die CT-Werte konnten ausgelesen werden. Der genaue Chimärismusgrad konnte nun mit Hilfe dieser und der bereits bestimmten Formeln (siehe 2.2.7.) berechnet werden.

### **2.2.9. CD3<sup>+</sup>-Isolation mit PBMCs**

Zunächst wurde ein 50ml Falcon mit 15ml Biocoll befüllt. In einem zweiten 50ml Falcon wurde 9ml EDTA-Blut mit 25ml Pufferlösung vermischt. Als Puffer diente bei der Isolation immer eine Mischung aus HBSS (500ml), EDTA (2ml) und FCS (5ml), welche in House gemischt wurde. Der Inhalt des zweiten Falcons wurde nun auf das Biocoll aufgeschichtet und wurde bei 2000rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Die nun in der Mitte entstandene Zellphase wurde in ein Falcon übertragen, welches anschließend mit Puffer auf 50ml aufgefüllt und bei 300g für 10 Minuten zentrifugiert wurden. Daraufhin wurden die Zellen abgezählt und nochmals bei 300g für 10 Minuten zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde mit 80µl Puffer je  $10^7$  Zellen resuspendiert und mit 20µl CD3<sup>+</sup>-Microbeads je  $10^7$  Zellen vermischt. Nach einer 15-minütigen

Inkubationszeit im Kühlschrank wurden 20ml Puffer hinzugegeben und bei 300g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500µl Puffer resuspendiert.

Die im Magnet eingespannten MACS-Säulen wurden zunächst mit 3ml Puffer beladen. Anschließend wurden die Zellen auf die Säulen gegeben und dreimal mit jeweils 3ml Puffer gespült. Nun wurden die Säulen aus dem Magneten genommen und die isolierten CD3<sup>+</sup>-Zellen mit 2ml Puffer aus diesen in ein neues Falcon ausgeschwemmt.

### **2.2.10. Zellfärbung und FACS**

Für die normale Zellfärbung wurde ein FACS Tube mit  $10^5$  bis  $2,5 \times 10^5$  Zellen gefüllt. Die Zellen wurden in 100µl Puffer (siehe 2.2.9.) gelöst und es wurden die jeweiligen Marker (Isotyp und CD3) hinzugegeben. Nach 15-minütiger Inkubationszeit im Kühlschrank wurde das Tube fast vollständig mit Pufferlösung gefüllt und für 10 Minuten bei 300g zentrifugiert. Zuletzt musste noch der Überstand abgekippt werden.

Im Anschluss an die Zellfärbung sind die Proben im NanoDrop untersucht worden. Hierbei wurde je Untersuchung eine ungefärbte Probe, eine mit CD3-Markern versehene Probe und eine Isotypenkontrolle untersucht.

### **2.2.11. Herstellung eines künstlichen CD3<sup>+</sup>-Chimärismus**

Für die Etablierung und Testung einer T-Zell-Untersuchung war es von Nöten, zunächst einen künstlichen Chimärismus zu erstellen, bei dem der jeweilige CD3<sup>+</sup>-Gehalt bekannt war.

Wie auch bei der Herstellung der Verdünnungsreihe für eine normale Chimärismusuntersuchung gingen auch dieser SYBR-Green Versuche voraus, in denen die passenden Allelkombinationen zwischen zwei Probanden gefunden wurden.

Zunächst wurden beiden Probanden jeweils 45ml Blut entnommen und daraus die PBMCs isoliert. Diese wurden daraufhin mit CD3-Markern gefärbt und der Anteil an CD3<sup>+</sup>-Zellen wurde mittels einer FACS-Untersuchung ausgemessen.

Nachdem nun die jeweiligen Anteile bekannt waren, konnten die Volumina der Proben berechnet werden, die jeweils ausgetauscht werden mussten, um einen 90%, 99,9% und 99,99%igen Spenderchimärismus zu erhalten.

Hieraufhin wurden die CD3<sup>+</sup> Zellen, wie in Punkt 2.2.9. beschrieben, isoliert und die DNA extrahiert.

In einem zweiten Ansatz dieses Versuches wurden die letzten Schritte erweitert, sodass bei der CD3<sup>+</sup>-Isolation die ausgewaschenen PBMCs zur weiteren Untersuchung aufbewahrt wurden.

### **2.2.12. Routineuntersuchung des CD3<sup>+</sup>-Chimärismus**

Je Untersuchung wurden 18ml EDTA-Blut des Patienten benötigt. Aus diesen wurden zunächst die PBMCs isoliert. Mittels der Microbeads konnten nun aus diesen die CD3<sup>+</sup> isoliert werden. Hierbei war darauf zu achten, dass die ausgewaschenen PBMCs nicht verworfen wurden.

Die T-Zellen wurden nun ausgezählt und es wurde eine kleine Fraktion für die Zellzytometrie gefärbt. Durch diese wurde der CD3<sup>+</sup>-Gehalt bestimmt.

Nun wurde die DNA für die RT-PCR sowohl aus den T-Zellen als auch aus den ausgewaschenen PMBCs extrahiert. Bei der Polymerase-Chain-Reaktion wurden je untersuchtem Allel je fünf Wells mit T-Zell-DNA und PBMC-DNA beladen. Hinzu kamen jeweils 3 Wells zur Ausmessung des HCK (siehe Abbildung 5). Das Programm für die RT-PCR ist in Tabelle 16 zu sehen.

CD3 <sup>+</sup> Allel	PBMC Allel		CD3 <sup>+</sup> HCK	PBMC HCK
CD3 <sup>+</sup> Allel	PBMC Allel		CD3 <sup>+</sup> HCK	PBMC HCK
CD3 <sup>+</sup> Allel	PBMC Allel		CD3 <sup>+</sup> HCK	PBMC HCK
CD3 <sup>+</sup> Allel	PBMC Allel			
CD3 <sup>+</sup> Allel	PBMC Allel			

Abbildung 5: Mögliches Pipettierschema für den CD3<sup>+</sup>-Chimärismus

### **2.2.13. Berechnung des CD3<sup>+</sup>-Chimärismus**

Nach der Berechnung der Mittelwerte konnte unter Zuhilfenahme der bereits festgelegten Formeln der prozentuale DNA-Anteil der CD3<sup>+</sup>-Zellen sowie der ausgewaschenen PBMCs mit den  $\Delta$ CT-Werten berechnet werden.

Nun wurde der prozentuale Anteil an CD3<sup>+</sup>-Zellen der Proben aus der FACS-Untersuchung ausgelesen. Dieser wurde mit dem DNA-Gehalt der PBMCs multipliziert und von dem DNA-Gehalt der CD3<sup>+</sup>-Zellen abgezogen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Anpassung der Methoden an die Chimärismusuntersuchung

Um die Untersuchung in der täglichen Routine anwenden zu können, galt es zunächst, den DNA-Gehalt bei den einzelnen Extraktionen zu erhöhen, da sowohl für die Untersuchungen als auch für die Erstellung der Standardkurven große DNA Mengen benötigt werden. Die Extraktion wird dadurch erschwert, dass der Leukozytengehalt nach einer allogenen Stammzelltransplantation stark erniedrigt sein kann. Durch die in Punkt 2.2.2. angewandten Verfahren konnte die durchschnittliche DNA-Konzentration bei den Proben der Standardkurven mehr als verdreifacht werden. Sie stieg von durchschnittlich 39,31 ng/dl auf 136,86 ng/dl an.

Eine weitere Veränderung fand in Bezug auf den verwendeten Mastermix statt. Es zeigte sich, dass die Charge des TaqMan® Gene Expression Master Mix exaktere Werte lieferte als der bis dahin verwendete TaqMan® Universal PCR Master Mix. Bis zu dem Zeitpunkt des Wechsels wurden sieben Standardkurven mit dem TaqMan® Universal PCR Master Mix erstellt. Im Vergleich wurde erkannt, dass die Standardabweichungen zwischen den einzelnen Wells mit dem TaqMan® Gene Expression Master Mix im Bereich von 0,01% Empfängerzellen in jedem Versuch deutlich geringer ausfielen. Auch die Durchschnittliche Standardabweichung ist mit dem TaqMan® Gene Expression Master Mix in 6 von 7 Versuchen geringer (siehe Abbildung 6).

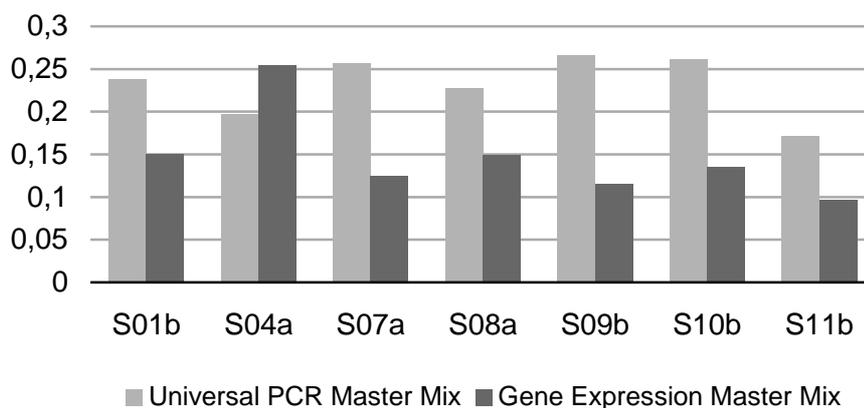


Abbildung 6:  
Vergleich der durchschnittlichen Standardabweichungen in Abhängigkeit vom verwendeten Master Mix. Abgesehen von Allel S04a ist bei allen Versuchen eine Reduktion der Standardabweichung zu erkennen.

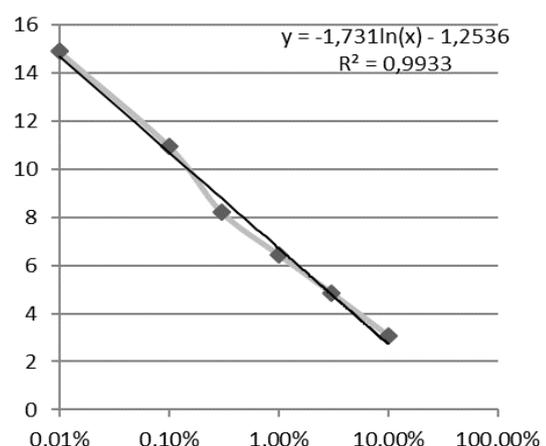
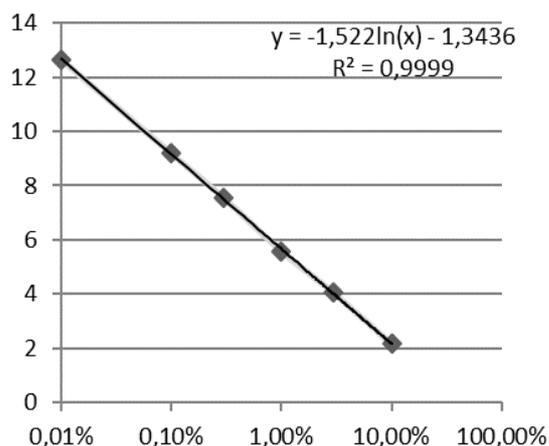
### 3.2. Ergebnisse der Standardkurven

Von den ursprünglich 19 untersuchten Sonden gelang es bei 17, eine Standardkurve und somit auch eine Gleichung zum Errechnen des Chimärismusgrades zu erstellen. Die beiden Allele S05a und S09a mussten ausgeschlossen werden, da sie bei allen untersuchten Probanden vorhanden waren und somit kein künstlicher Chimärismus erzeugt werden konnte.

Bei der Auswertung der restlichen Allele zeigte sich, dass die Signale insgesamt sehr gut vom StepOnePlus™ gemessen werden konnten. So waren sämtliche Signale bis hin zu einer 0,1-prozentigen Verdünnung auswertbar. Lediglich im Bereich der 0,01-prozentigen Verdünnung kam es vor, dass die Signale vom Gerät nicht mehr erkannt wurden. Im Durchschnitt waren jedoch 65,7% der Proben auswertbar. Hierbei ist anzumerken, dass nur bei dem Allel S11a keine Amplifikation im Bereich von 0,01% nachweisbar war.

Im Hinblick auf die Abstände der  $\Delta CT$ -Werte nach jeder 1:10 Verdünnung zeigte sich eine große Annäherung an den zu erwartenden Abstand von 3,3 durch die neue Methode. Der Wert betrug im Durchschnitt  $3,47 \pm 0,3708$ .

Ein weiterer Beleg für die Genauigkeit zeigt sich bei den  $R^2$ -Werte. Diese lagen bei der Auswertung zwischen 0,9933 (S03) und 0,9999 (S01a), womit ein fast perfekter linearer Zusammenhang besteht.



### 3.3. Verlässlichkeit der Methode

Da die Chimärismusuntersuchung in der täglichen Routine angewendet wird, muss ein besonderes Augenmerk auf die Verlässlichkeit der Methode gerichtet werden. Hierfür wurden zu Beginn mehrere Versuche durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und den Einfluss von äußeren Faktoren zu überprüfen.

Die erste Fragestellung bezog sich auf die verwendeten DNA-Mengen, da es, wie bereits erwähnt, im klinischen Alltag nicht sicher ist, ob aus jeder Probe genügend DNA extrahiert werden kann, um jedes Well wie vorgesehen mit 100ng zu beladen. Um zu prüfen, wie sich die Ergebnisse mit niedrigeren DNA-Mengen verändern, wurden zwei Proben mit jeweils zwei Allelen getestet. Hierbei wurden die Wells jeweils mit immer geringeren DNA-Mengen beladen (100ng, 75ng, 50ng, 20ng und 10ng). In der ersten Probe ergab sich für das Allel S01b ein Mittelwert von  $98,47\% \pm 0,11\%$  und für das Allel S04a ein Mittelwert von  $98,95\% \pm 0,07\%$ . Zusammengefasst ergibt sich ein Mittelwert von  $98,71\% \pm 0,27\%$ . In der zweiten Probe ergibt sich für S01b ein Mittelwert von  $86,70\% \pm 0,88\%$ , für S04b ein Wert von  $74,64\% \pm 1,98\%$  und gesamt  $80,67\% \pm 6,60\%$ . Somit erkennt man bei allen untersuchten Allelen ein hohes Maß an Stabilität bis hin zu einer verwendeten DNA-Konzentration von 10ng/Well. Interessanterweise zeigte sich, dass die Ergebnisse eher von den verwendeten Allelen selbst als vom DNA-Gehalt abhängig sind.

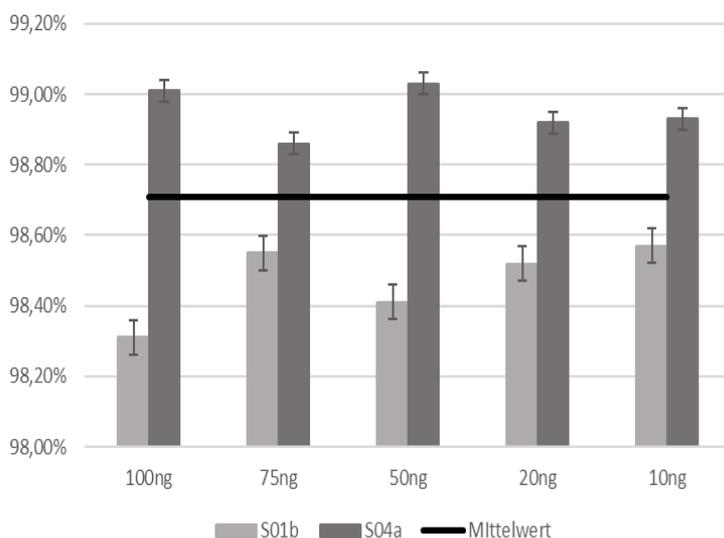


Abbildung 9:  
Auswertung der Allele S01b (hell) und S04a (dunkel) unter Verwendung von immer geringeren DNA-Mengen bei einem Chimärismusgrad von  $98,71\% \pm 0,27\%$  (schwarze Linie).

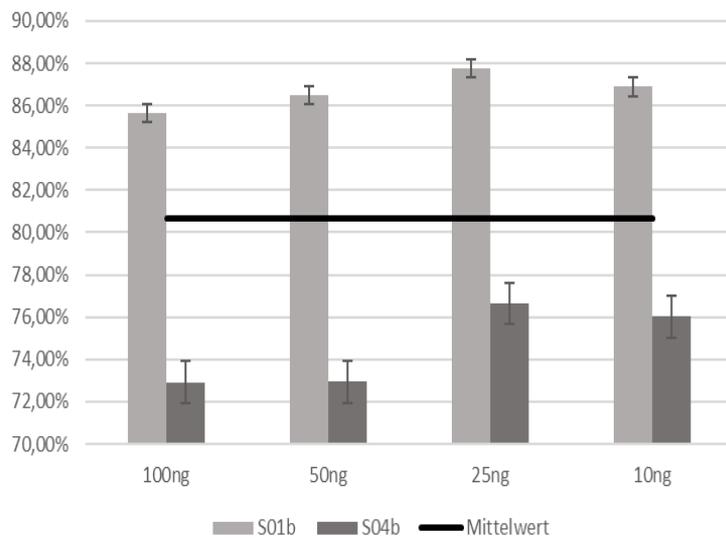


Abbildung 10:  
Auswertung der Allele S01b (hell) und S04b (dunkel) unter Verwendung von immer geringeren DNA-Mengen bei einem Chimärismusgrad von  $80,67\% \pm 6,60\%$  (schwarze Linie).

Die nächste Fragestellung bezog sich auf den Einfluss von häufigem Einfrieren und Auftauen der Proben, da die Aufbewahrung der Proben ebenfalls einen Einfluss auf die Ergebnisse haben könnte. Hierfür wurde eine Probe an sechs aufeinander folgenden Tagen aufgetaut und anschließend wieder eingefroren. Aus jeweils einem kleinen Anteil des Blutes wurde die DNA extrahiert. Diese wurde gemäß dem normalen Routineprotokoll mit den Allelen S05b und S07a untersucht. Bei der Auswertung zeigte sich keine Abhängigkeit der Ergebnisse von der Anzahl an Gefrierzyklen. Es ergab sich ein Mittelwert von  $99,32\% \pm 0,09\%$  bei S05b und  $98,67\% \pm 0,18\%$  bei S07a. Betrachtet man alle Ergebnisse, so ergibt sich ein Mittelwert von  $99,00\% \pm 0,37\%$ . Wie schon bei dem vorangegangenen Versuch ist ein größerer Unterschied der Ergebnisse zwischen zwei Allelen als bei den Werten derselben Sonde zu erkennen.

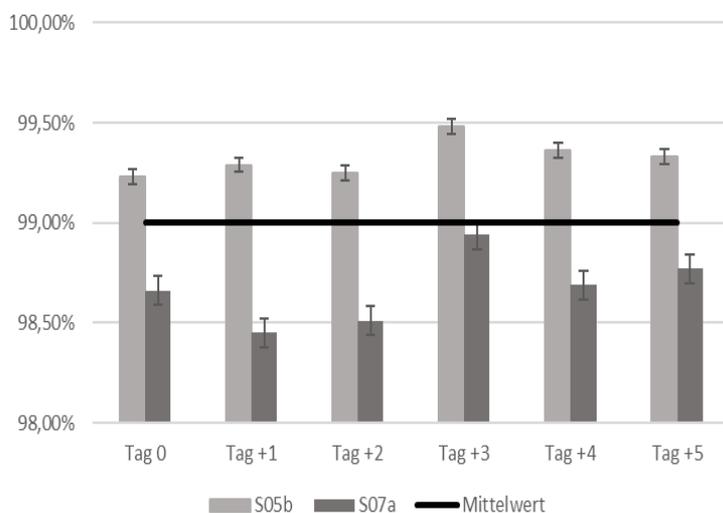


Abbildung 11:  
Auswertung der Ergebnisse von S05b (hell) und S07a (dunkel) in Abhängigkeit von häufigem Einfrieren und wieder Auftauen bei einer Probe mit dem Chimärismusgrad von  $99,00\% \pm 0,37\%$  (schwarze Linie). Insgesamt wurde die Probe an 6 Tagen aufgetaut und wieder eingefroren.

Letztlich bestand noch die Frage nach der Reproduzierbarkeit von Ergebnissen. Um diese zu überprüfen, wurden vier Verlaufskontrollen ausgewählt und mit insgesamt 15 Sonden nochmals ausgewertet. Hierbei wurde jeweils jede Sonde mehrfach getestet. Wie erwartet war eine deutliche Zunahme der Streuung der Ergebnisse erkennbar je höher der Anteil an Empfängerzellen in der Probe war. So betrug die Standardabweichung von allen untersuchten Allelen bei 0,97% nachgewiesenen Empfängerzellen lediglich 0,2% (Diagramm A), wohingegen diese bei 4,64% schon auf 1,38% (Diagramm B) anstieg. Die beiden letzten Proben haben jeweils einen Anteil an Spenderzellen von unter 90% (Diagramm C und D). Man erkannte hierbei eine deutliche Steigerung der Streuung bis hin zu dem Punkt, an dem das Verfahren an seine Grenzen stieß. So ergaben sich bei drei Sonden Anteile an Spenderzellen von über 100%. Jedoch auch ohne diese Werte zeigten die Ergebnisse der Empfängerchimärismen mit  $51,21\% \pm 24,78\%$  und  $62,02\% \pm 26,94\%$  eine übermäßige Streuung. Wie schon in den vorangegangenen Versuchen zeigte sich eine geringere Streuung innerhalb der einzelnen Allele als im Vergleich zwischen ihnen.

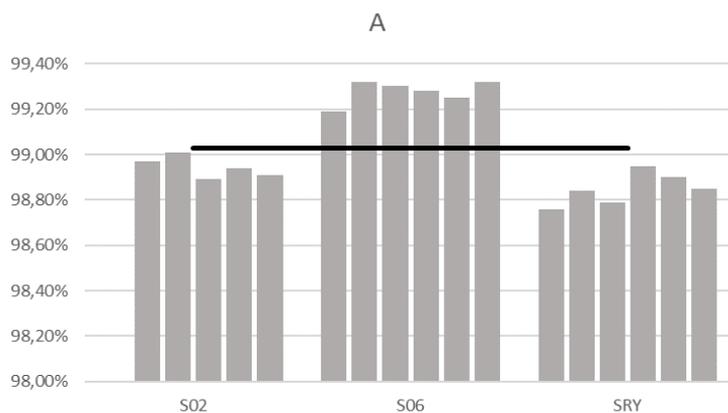


Diagramm A:  
Donorchimärismus von 99,03% (schwarze Linie). Der Empfängerchimärismus beträgt 0,97% mit einer Standardabweichung von 0,2%. Die drei verwendeten Sonden (S02, S06 und SRY) wurden jeweils fünf Mal getestet.

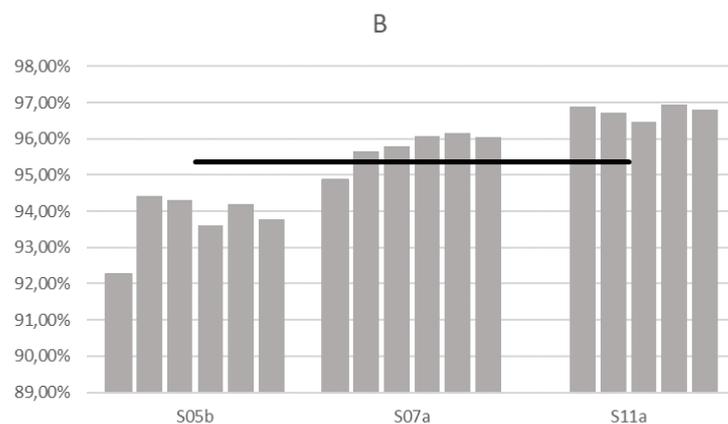


Diagramm B:  
Donorchimärismus von 95,36% (schwarze Linie). Der Empfängerchimärismus beträgt 4,64% mit einer Standardabweichung von 1,38%. Die drei verwendeten Sonden (S05b, S07a und S11a) wurden jeweils fünf Mal getestet.

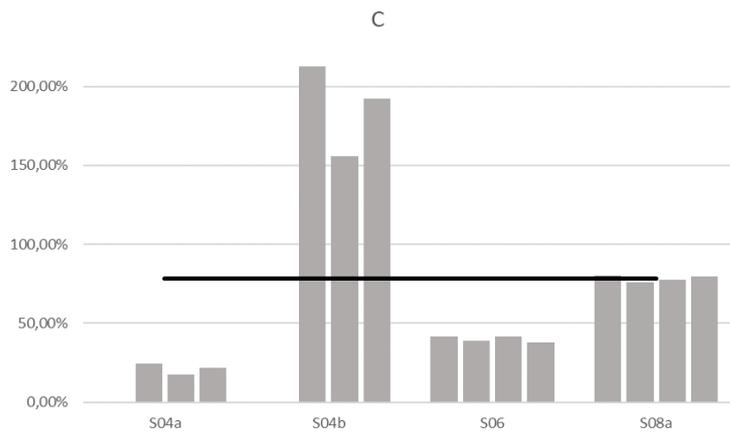


Diagramm C:  
 Donorchimärismus von 78,38% (21,62% Empfängerchimärismus). Bei S04b zeigt sich ein Donorchimärismus von >100%. Ohne diese Werte ergibt sich ein Empfängerchimärismus von 51,21% ±24,78%. Die Sonden S04a und S04b wurden jeweils drei Mal und die Sonden S06 und S08a wurden jeweils vier Mal ausgetestet.

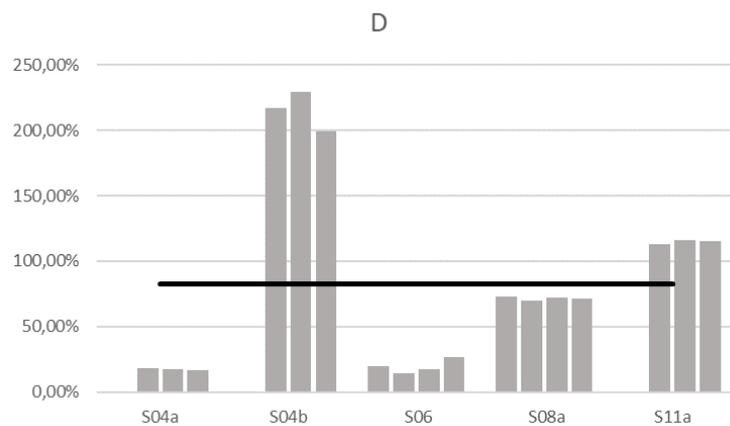


Diagramm D:  
 Donorchimärismus von 82,83% (17,17% Empfängerchimärismus). Sowohl bei S04b, als auch bei S11a zeigen sich Donorchimärismuswerte >100%. Ohne diese Werte ergibt sich ein S Die Allele S04a, S04b und S11a wurden jeweils drei Mal und die Allele S06 und S08a wurden jeweils vier Mal ausgetestet.

Abbildung 12:  
 Versuchsreihe zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit von Ergebnissen. Es wurden 4 Proben mit bereits festgelegtem Chimärismusgehalt mit drei (Diagramm A/B), vier (Diagramm C) und fünf Allelen (Diagramm D) untersucht. Gezeigt wird der Anteil der Spenderzellen.

Der Vermutung, dass Allele, die mit derselben Verdünnungsreihe geeicht wurden, ähnlichere Ergebnisse ergeben, widerspricht die Tatsache, dass dies nicht wie zu erwarten bei S04a und S06 sondern bei den Allelen S06 und S08a der Fall war.

### 3.4. Ergebnisse der Routineuntersuchung

Zur weiteren Auswertung wurden die Ergebnisse der Routineuntersuchungen im Zeitraum von Juli 2013 bis einschließlich Dezember 2016 betrachtet. In diesem wurden Nachsorgeuntersuchungen bei 348 allogenen Stammzelltransplantationen von 332 Patienten durchgeführt und es wurden 2709 Proben untersucht.

Während dieser Zeit wurde jedes Allel durchschnittlich  $651,13 \pm 24,67$ -mal ausgetestet. Hiervon ausgeschlossen sind die Sonden von SRY und S02. Da diese beiden Allele nur auf dem Y-Chromosom vorkommen, werden sie nur bei der Kombination eines männlichen Patienten und einer weiblichen Spenderin, oder bei Unkenntnis der Geschlechter ausgetestet. Somit werden diese deutlich seltener untersucht. Die prozentuale Verteilung der einzelnen Allele ist in Abbildung 13 zu sehen.

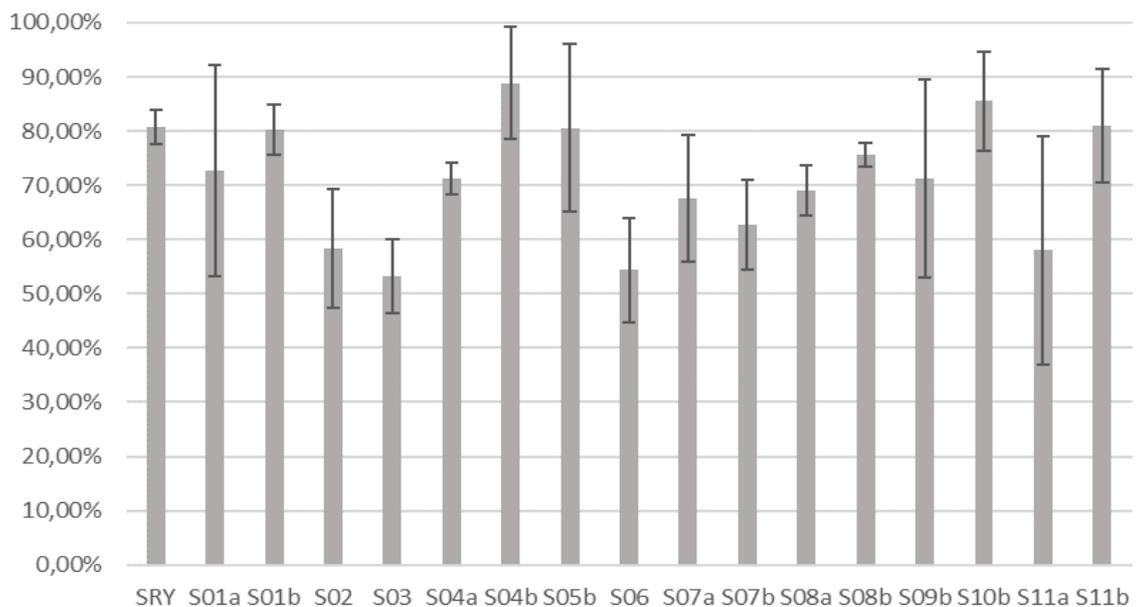


Abbildung 13:  
Prozentuale Auflistung der nachgewiesenen Allele zwischen den Jahren 2013 und 2016.

Betrachtet man nun die Verwendung der Allelkombinationen, so erkennt man, dass manche Sonden wie SRY, oder auch S11b relativ stabil in ihrer Nutzung geblieben sind. Viele andere Allele, wie vor allem S11a und S03, weisen hierbei jedoch deutliche Schwankungen auf. Ein Zusammenhang mit der prozentualen Verteilung der einzelnen Allele ist nicht zu erkennen. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass die untersuchte Kohorte noch keine ausreichende Größe erreicht hat, um eine abschließende Bewertung zuzulassen. Eine genaue Aufteilung der verwendeten Sonden ist in Abbildung 14 zu erkennen.

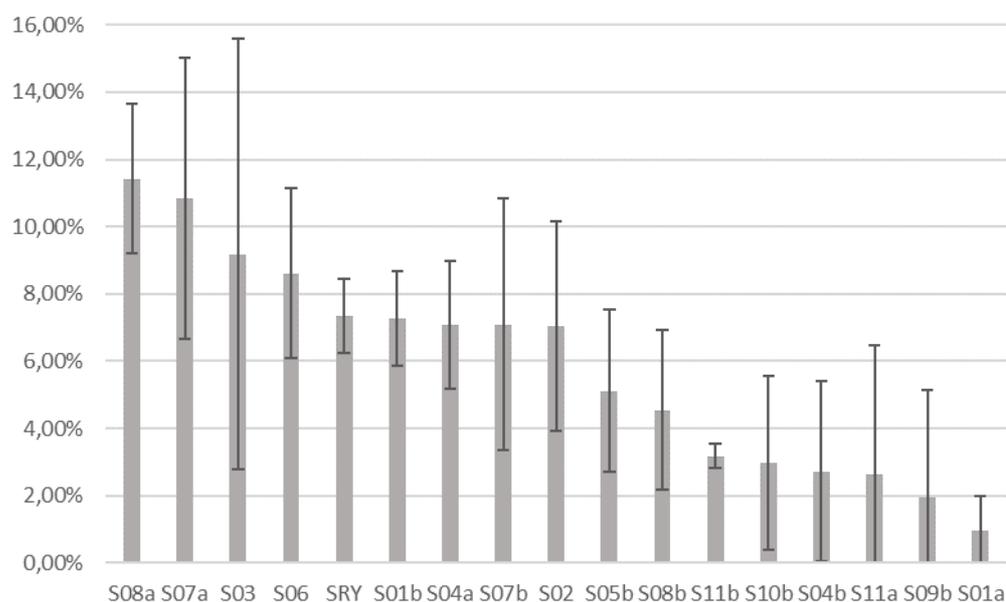


Abbildung 14:  
 Prozentuale Auflistung der Verwendung der einzelnen Allele in den Jahren 2013 bis 2016. Deutlich zu erkennen ist die starke Standardabweichung der Allele S03 und S11a. SRY sowie S11b weisen eine deutlich geringere Standardabweichung auf.

Trotz der hohen Anzahl an untersuchten Genloci wurde bei 41 (11,78%) von 348 Spender-Empfänger-Paaren keine passende Allelkombination gefunden. Somit konnte bei diesen keine Chimärismusuntersuchung durchgeführt werden.



Abbildung 15:  
 Anteil der Spender-Empfänger-Paare, bei denen eine passende Kombination gefunden wurde (hell) bzw. nicht gefunden wurde (dunkel). Zu erkennen ist ein stabiler Anteil von insgesamt 11,78% der Spender-Empfänger-Paare, bei denen keine passende Kombination gefunden werden konnte.

Aufgrund dieser fehlenden Allelkombination mussten 170 Proben in ein externes Haus versendet werden. Zusätzlich hierzu kamen noch 141 Proben, die zur Nachttestung verschickt wurden, da am Anfang dieser neuen Untersuchungsmethode Proben mit einem Spenderchimärismus von <95% zur nochmaligen Validierung kontrolliert wurden. Im weiteren Verlauf wurde dieser Threshold herabgesetzt, nachdem sich die Methode als ausgesprochen sicher erwies. So wurden noch im Jahr 2013 22 Proben (33,3%) zur Nachttestung versandt, wohingegen im Jahr 2016 lediglich 3 (0,3%) verschickt werden mussten. Ein weiterer Grund für das Versenden von Proben waren uneindeutige Ergebnisse. Eine genaue Aufschlüsselung der Probenzahlen ist in Abbildung 16 zu erkennen.

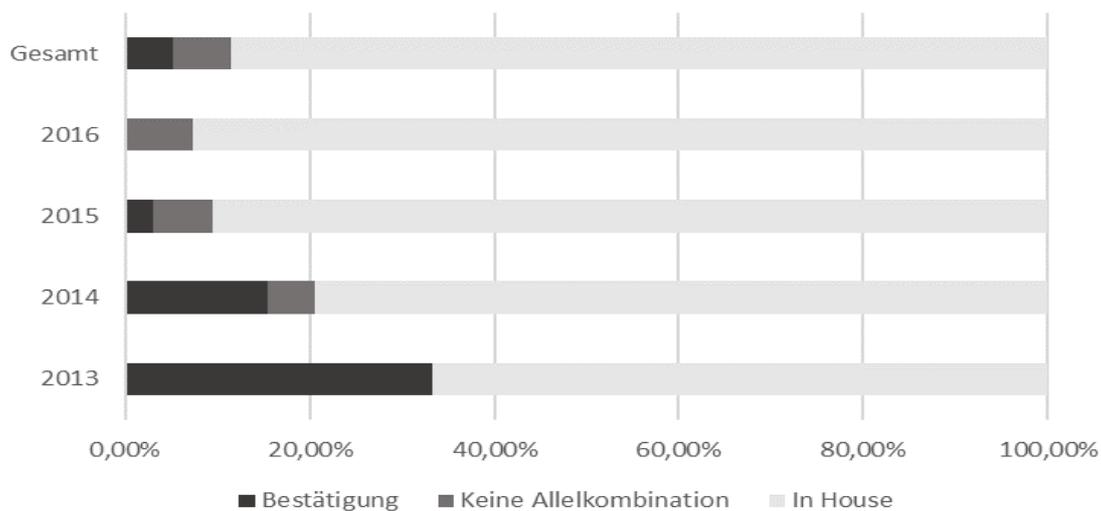


Abbildung 16:  
 Darstellung der versandten Proben. Deutlich zu erkennen ist der stete Rückgang der zur Bestätigung versandten Proben (gesamt 5,2% / 141 Proben) im betrachteten Zeitraum. Der Anteil der Proben ohne Allelkombination blieb in den Jahren 2014-2016 weitestgehend stabil (gesamt 6,3% / 170 Proben).  
 Insgesamt wurden 311 von 2709 Proben zwischen 2013 und 2016 versandt (11,5%).

### 3.5. Ringversuche

Zur weiteren Überprüfung der Ergebnisse und im Rahmen der Qualitätssicherung der quantitativen RT-PCR nimmt das Labor regelmäßig an den INSTAND-Ringversuchen teil.

Die oben genannten Beobachtungen wurden zum großen Teil von den Ringversuchen bestätigt. So lagen die Werte bei 8 von 9 Proben, die einen Empfängerzellen-Anteil von <10% aufwiesen, innerhalb der ersten Standardabweichung des Ergebnisses und in einem Fall innerhalb der zweiten Standardabweichung. Der letztgenannte Wert wurde im Rahmen einer Versuchsreihe gemessen, in der das Labor unterdurchschnittlich gut abgeschlossen hat.

Bezüglich der Messergebnisse der Proben mit einem Empfängerzellen-Anteil von >10% zeigte sich 2015 bei allen fünf Proben eine Divergenz von mehr als 2 Standardabweichungen. Interessanterweise waren es 2016 nur noch zwei von sechs Proben. Von den restlichen vier Versuchen waren jeweils zwei Proben eine bzw. zwei Standardabweichungen entfernt.

Die Verwendung von unterschiedlichen Allelen als Ursache für die Verbesserung der Ergebnisse kann ausgeschlossen werden, da für sämtliche Proben die Sonden S03 und S11a verwendet wurden. Somit hat das Labor in drei von vier Ringversuchen überdurchschnittlich gut abgeschlossen, obwohl Allele verwendet wurden, die aufgrund ihrer vergleichsweise schlechteren Ergebnisse bei den Eichungen im klinischen Alltag nur dann Anwendung finden, wenn keine andere Sonde verwendet werden kann.

Im Juni 2015 und August 2016 gab es jeweils einen Chargenwechsel des Gene-Expression-Master-Mix, wobei jeweils die Standardkurven neu geeicht wurden. Somit wäre eine ungeeignete Charge oder eine Ungenauigkeit bei der Erstellung der Standardkurven eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Abschneiden der Ringversuche von April 2015 im Vergleich mit den anderen drei Ringversuchen.

Jahr	Messwert	Ziel	Abweichung	Jahr	Messwert	Ziel	Abweichung
<b>April 2015</b>	34,90 %	66,10 %	>2s	<b>April 2016</b>	0,00 %	0,00 %	1s
	13,94 %	26,10 %	>2s		2,65 %	3,10 %	1s
	1,42 %	1,87 %	2s		60,10 %	73,60 %	2s
	6,27 %	10,70 %	>2s		35,64 %	39,10 %	1s
	9,75 %	17,70 %	>2s		64,82 %	98,10 %	>2s
<b>November 2015</b>	59,90 %	88,59 %	>2s	<b>November 2016</b>	0,00 %	0,00 %	1s
	4,59 %	5,64 %	1s		2,47 %	2,20 %	1s
	4,55 %	5,66 %	1s		73,65 %	64,30 %	2s
	4,68 %	6,23 %	1s		85,40 %	89,70 %	1s
	2,96 %	3,57 %	1s		94,14 %	100,00 %	>2s

Tabelle 17:

Auflistung der Ergebnisse der 4 Ringversuche, an denen das Uniklinikum Würzburg in den Jahren 2015 und 2016 teilgenommen hat. Deutlich zu erkennen das bessere Abschneiden ab November 2015 und die höhere Genauigkeit, die bei Chimärismusergebnissen von <10% besteht.

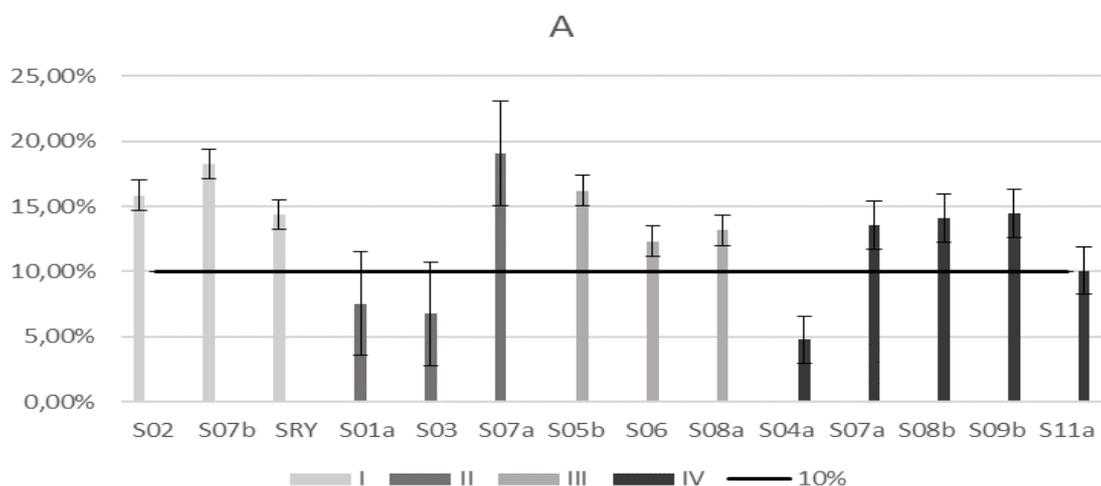
### 3.6. Aufbau des CD3<sup>+</sup>-Chimärismus

Aufgrund der Schlüsselposition, die die T-Zellen im Rahmen der allogenen Stammzelltransplantation einnehmen, bestand eine weitere Fragestellung darin, ob der Assay dafür verwendet werden kann, den Chimärismusgrad der CD3<sup>+</sup>-Zellen zu messen.

Wie in Punkt 2.2.11. beschrieben, wurden hierfür zunächst Proben mit geeichtem T-Zell-Gehalt erstellt. Im Folgenden ist zu beachten, dass die Proben I und II und die Proben III und IV in der jeweils selben Versuchsreihe erstellt wurden. Es wurde ein 10%iger, 0,1%iger und 0,01%iger Empfängerzellanteil untersucht. Ersterer diente als Kontrolle, ob man aufgrund des deutlich erniedrigten DNA-Gehaltes nach T-Zell-Isolation noch ein Signal messen kann. Zweiterer wurde ausgewählt, da dies als die Nachweisgrenze des Labors angegeben wurde und der letzte Wert stellt die Nachweisgrenze des Assays dar. Aus den Proben wurden die T-Zellen mittels Microbeads, wie in Punkt 2.2.9. beschreiben, isoliert und deren DNA extrahiert. Diese wurde daraufhin wie in den vorangegangenen Versuchen mittels RT-PCR untersucht.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 zu sehen. Es ist deutlich erkennbar, dass die Ergebnisse bei Mittelwerten von jeweils 12,88%±4,24%, 0,15%±0,06% und 0,03%±0,01% im Durchschnitt zu hoch sind.

Als mögliche Erklärung hierfür wurde ein Rest-PBMC Anteil in den Proben, trotz T-Zell Isolation diskutiert. Dieser könnte zu einer verstärkten DNA Amplifikation und in Folge dessen zu höheren Messwerten führen.



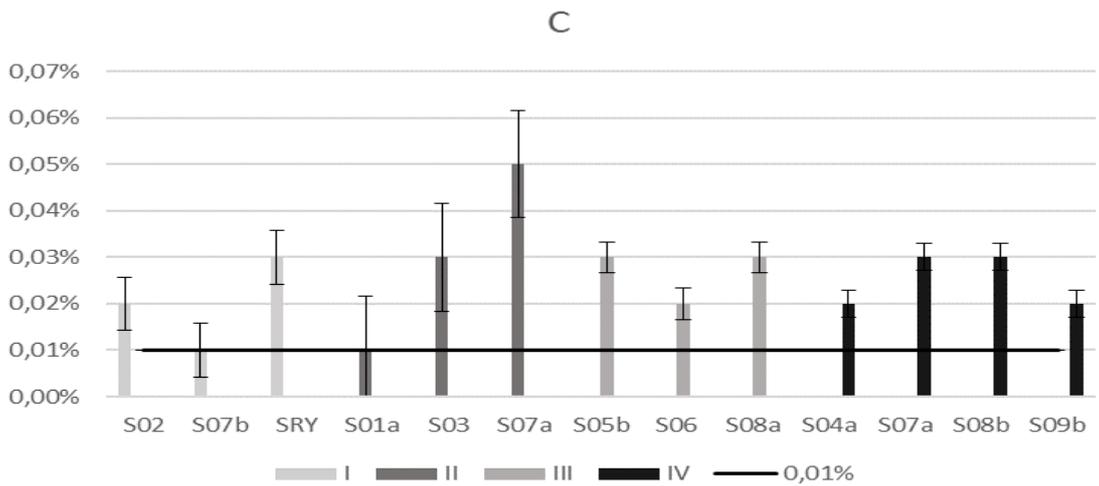
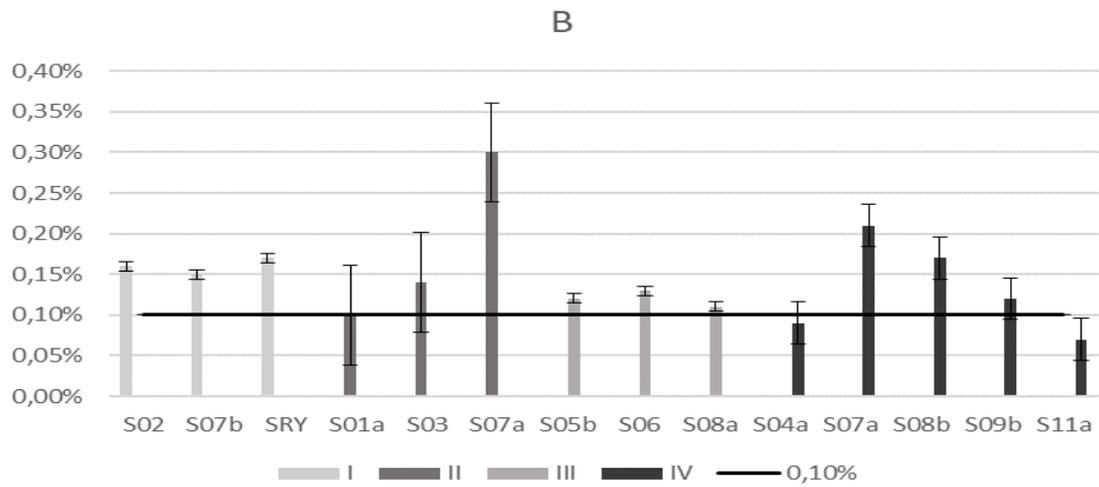


Abbildung 17: Ergebnisse der Ausmessung des T-Zell-Chimärismus. Für jede der 4 Proben (I, II, III, IV) wurde ein künstlicher T-Zell Chimärismus mit 10%, 0,1% und 0,01% T-Zell Chimärismus erzeugt. Probe I, II, und III wurden mit jeweils 3 Allelen ausgetestet. Probe IV wurde mit je 5 Allelen bei T-Zell Chimärismuswerten von 10% und 0,1%. Bei 0,01% wurde hierbei auf eine Verwendung von S11a bei verzichtet, da es bei diesem Allel zu schlechten Ergebnissen in diesem Bereich in den Voruntersuchungen kam.

A: 10% Empfänger Anteil (schwarze Linie): Der Mittelwert der Proben liegt bei  $12,88\% \pm 4,24\%$ ,

B: 0,1% Empfänger Anteil (schwarze Linie): Der Mittelwert der Proben liegt bei  $0,15\% \pm 0,06\%$

C: 0,01% Empfänger Anteil (schwarze Linie): Der Mittelwert der Proben liegt bei  $0,03\% \pm 0,01\%$

Um diesen möglichen Fehler zu minimieren, wurde die Untersuchung so abgeändert, dass es möglich war, die Signale der restlichen PBMCs aus dem Ergebnis herauszurechnen.

Hierfür war es, wie in Punkt 2.2.12. beschrieben, nötig, die ausgewaschenen PBMCs aufzufangen und den Chimärismusgrad sowohl aus diesen als auch aus den T-Zellen zu bestimmen. Nachdem nun mittels FACS der PBMC-Gehalt der T-Zell-Probe ausgemessen wurde, konnte man das überschüssige Signal ausschließen.

Zur Überprüfung dieser Methode wurden nochmals Proben mit definiertem T-Zell-Gehalt erstellt und mittels mehrerer Sonden überprüft. Bei näherer Betrachtung der Ergebnisse zeigte sich ein deutlicher Unterschied der Ergebnisse von Probe V und Probe VI. So ist bei einem Empfängerzellanteil von 10% der Mittelwert von Probe V bei  $8,43\% \pm 2,86\%$  und der von Probe VI bei  $21,78\% \pm 6,89\%$ . Im Bereich von 0,1% liegen die Werte bei  $0,12\% \pm 0,06\%$  bzw. bei  $0,21\% \pm 0,07\%$ . Dies legt den Verdacht nahe, dass es bei der Erstellung der Proben zu einer ungleichmäßigen Verteilung der T-Zellen gekommen ist, wodurch die Ergebnisse nur bedingt aussagekräftig sind.

Dennoch zeigt sich bei den PBMC-Anteilen ein Mittelwert von  $1,58\% \pm 0,69\%$  bzw.  $0,02\% \pm 0,01\%$ , der von den jeweiligen Probenergebnissen abgezogen wurde.

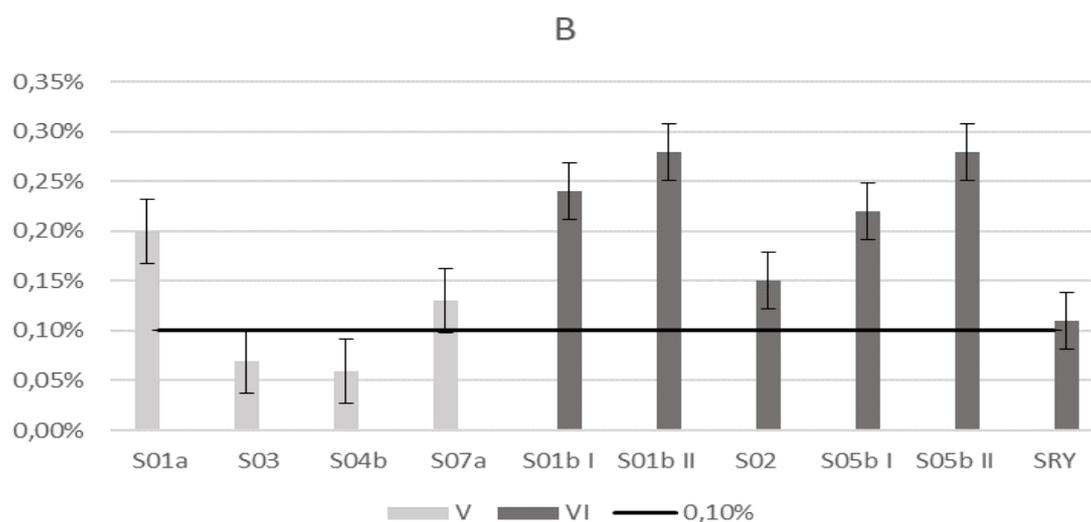
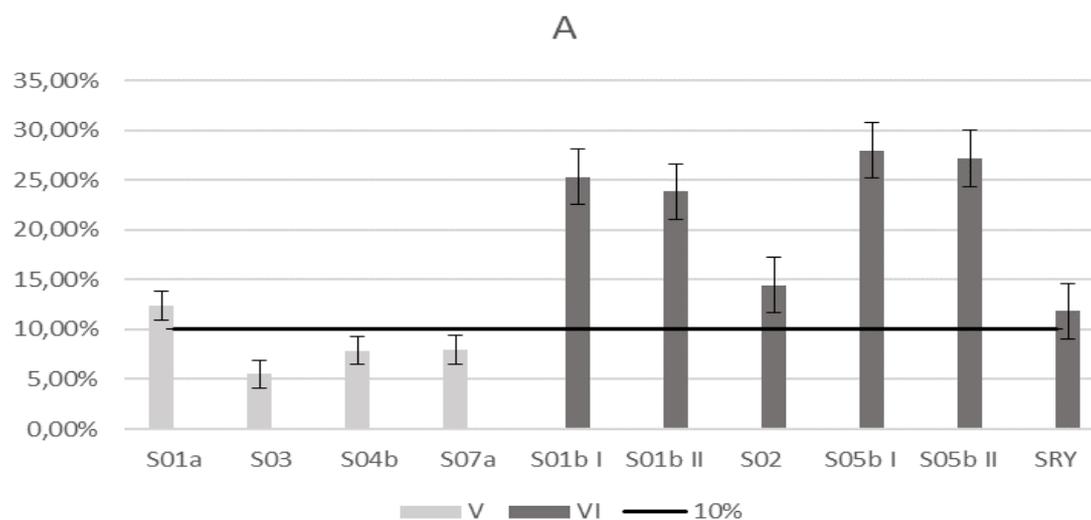


Abbildung 18:

Ergebnisse der Ausmessung des T-Zell-Chimärismus mit Berücksichtigung des PBMC-Restsignals. Es wurden nochmals Proben mit geeichtem T-Zell-Chimärismus erstellt (V, VI). Es wurde jeweils ein Chimärismus mit einem Empfängerzellanteil von 10% und 0,1% erstellt. Probe V wurde mit 4 Sonden, Probe VI mit jeweils 6 Sonden untersucht.

A: 10% Empfänger-Anteil (schwarze Linie): Der Mittelwert liegt bei Probe V bei 8,43%±2,86% und bei Probe VI bei 21,78%±6,89%

B: 0,1% Empfänger-Anteil (schwarze Linie): Der Mittelwert liegt bei Probe V bei 0,12%±0,06% und bei Probe VI bei 0,21%±0,07%

### 3.7. Ergebnisse der Routineuntersuchung des CD3<sup>+</sup>-Chimärismus

Im Zeitraum von Juli 2013 bis Dezember 2016 wurden insgesamt 128 Chimärismusuntersuchungen von T-Zellen durchgeführt. Bei sechs Proben (4,69%) gelang keine Auswertung der Ergebnisse. Unter Berücksichtigung der Versuche, bei denen aufgrund einer zu niedrigen Zellkonzentration die Durchführung einer FACS-Untersuchung nicht möglich war, steigt diese Anzahl auf 13 (10,16%). Eine zusätzliche Problematik zeigte sich in der Berechnung der Ergebnisse. So ergab sich bei 33 (15,35%) von 215 getesteten Allelen ein Wert von <0,00% Empfänger-T-Zell-Anteil nach Abzug des PBMC-Gehaltes.

Im zeitlichen Verlauf ist zu erkennen, dass der Anteil an nicht auswertbaren Allelen mit einem Mittelwert von 6,51% stabil bleibt. Im Gegensatz dazu ist ein starker Abfall der Werte zu verzeichnen, die einen T-Zell-Anteil von unter 0,00% aufweisen. Letzteres stimmt mit den oben genannten Ergebnissen überein, welche eine höhere Genauigkeit der Ergebnisse in den Jahren 2015 und 2016 zeigten.

Eine genaue Auflistung der Ergebnisse ist in Tabelle 18 und 19 zu sehen.

	Proben	Nicht auswertbar		Werte <0,00%	
2014	27	3	11,11%	10	37,04%
2015	61	3	4,91%	3	4,92%
2016	40	0	0,00%	4	10,00%
Gesamt	128	6	4,69%	17	13,28%

Tabelle 18: Übersicht der nicht auswertbaren Proben, sowie der Proben, die nach Abzug des PBMC Anteils Werte von unter 0,00% aufwiesen. Deutlich zu erkennen ist hierbei der Unterschied von Werten von <0,00% in den Jahren 2015 und 2016.

	Sonden	Nicht auswertbar		Werte <0,00%	
2014	45	3	6,67%	20	44,44%
2015	100	8	8%	6	6,00%
2016	75	3	4,29%	7	10,00%
Gesamt	215	14	6,51%	33	15,35%

Tabelle 19: Übersicht der nicht auswertbaren Sonden/Allele, sowie der Sonden, die nach Abzug des PBMC Anteils Werte von unter 0,00% aufwiesen. Ebenso wie in Tabelle 18 ist hierbei der deutliche Abfall an Werten <0,00% in den Jahren 2014 und 2015/16 zu erkennen.

Für die Auswertung der prozentualen PBMC-Anteile, die von den jeweiligen Proben abgezogen wurden, wurden diese in 5 Gruppen (<0,1%, 0,1-1%, 1-5%, 5-10%, >10%) unterteilt.

Wie bereits beschrieben zeigte sich auch hier ein deutlicher Unterschied zwischen den Ergebnissen des Jahres 2014 und den Jahren 2015/2016. So war der prozentuale Anteil an PBMCs in den letzten beiden Jahren deutlich geringer als 2014. Vor allem im Bereich von 0,1%-1% ist dies erwähnenswert, da hier im Jahr 2014 in jeder Probe ein Wert von >2% gemessen wurde und somit alle Endergebnisse Werte von <0,00% ergaben.

Die jeweiligen Werte sind in Abbildung 19 zu sehen.

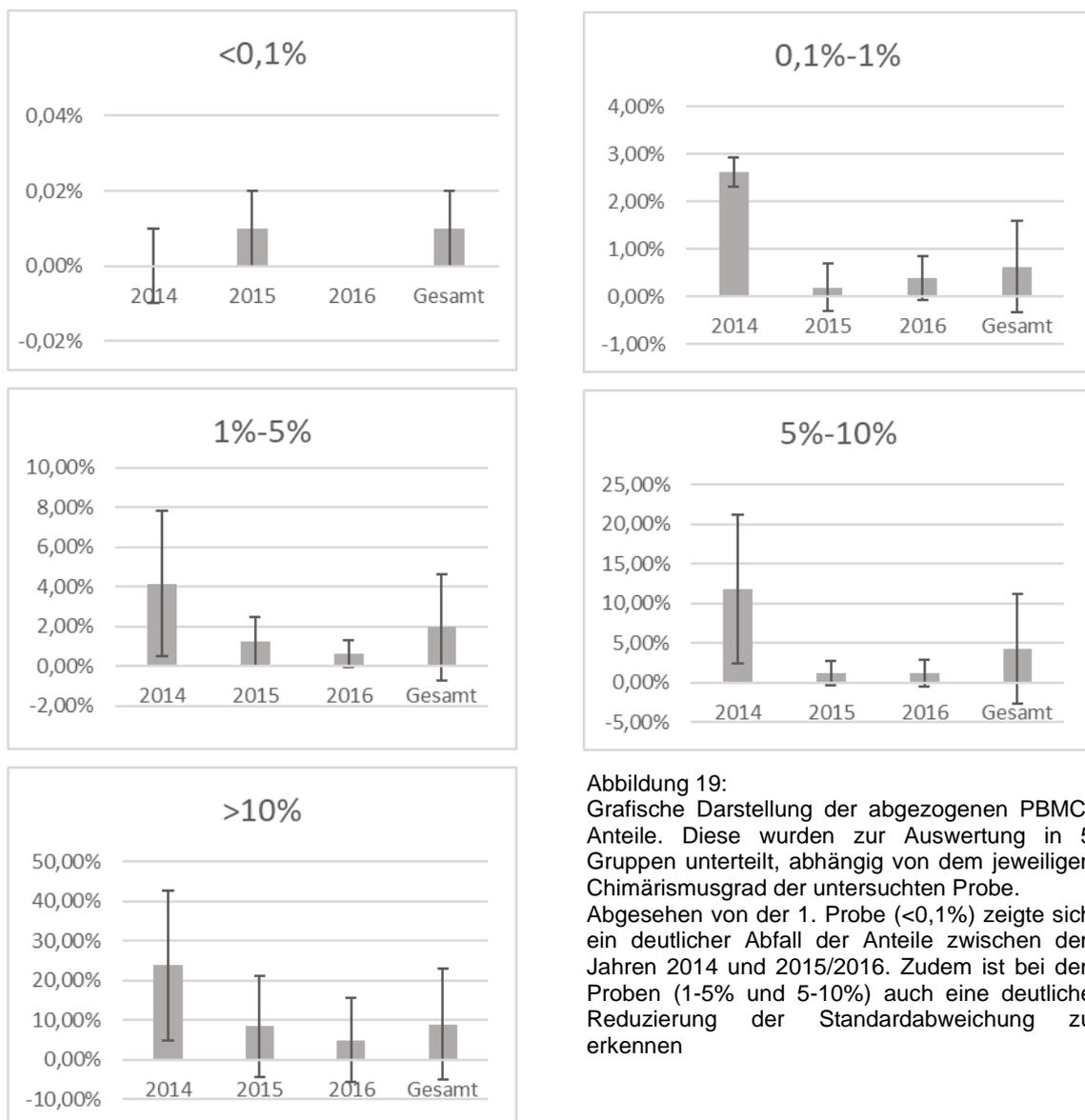


Abbildung 19:  
Grafische Darstellung der abgezogenen PBMC-Anteile. Diese wurden zur Auswertung in 5 Gruppen unterteilt, abhängig von dem jeweiligen Chimärismusgrad der untersuchten Probe. Abgesehen von der 1. Probe (<0,1%) zeigte sich ein deutlicher Abfall der Anteile zwischen den Jahren 2014 und 2015/2016. Zudem ist bei den Proben (1-5% und 5-10%) auch eine deutliche Reduzierung der Standardabweichung zu erkennen

## 4. Diskussion

### 4.1. Resümee der Chimärismusuntersuchung

In Zusammenschau der Ergebnisse der letzten Jahre haben sich sowohl viele positive als auch negative Aspekte dieser speziellen Untersuchungsmethode gezeigt.

Der wohl größte Vorteil der Chimärismusuntersuchung mittels der RT-PCR ist die hohe Sensitivität, die mit dieser Methode erreicht werden kann.<sup>[17]</sup> Mit dieser ist es möglich, einen gemischten Chimärismus zu erkennen, auch wenn er <1% der Patientenzellen beträgt.<sup>[17, 26]</sup> Dies bringt weitreichende diagnostische Folgen mit sich. So lässt sich deutlich früher das Wiederauftreten von malignen Zellen nachweisen und ein iMC (increasing Mixed Chimerism) kann früher bemerkt werden.<sup>[26-28]</sup> Demzufolge kann ein Rezidiv rechtzeitig erkannt werden und notwendige therapeutische Maßnahmen können zeitnah ergriffen werden.<sup>[26-28]</sup> Auch hat bei der hohen Sensitivität des Verfahrens der Nachweis eines kompletten Chimärismus eine deutlich höhere Aussagekraft als andere Verfahren, bei denen bei Chimärismuswerten von <1% keine Aussage über die Zellverhältnisse getroffen werden können.<sup>[26]</sup>

Ein weiterer Vorteil ist das hohe Maß an Verlässlichkeit, die dieses Verfahren aufweist. Nachdem wir uns im Laufe des Jahres 2014 dazu entschlossen hatten, nur noch Proben, bei denen eine Auswertung in House nicht möglich war, zur weiteren Abklärung zu versenden, konnten im Jahr 2015 97% und im Jahr 2016 99,7% aller Proben, bei denen eine Allelkombination gefunden wurde, in unserem Labor ausgewertet werden.

Hinzu kommen die Stabilität und Genauigkeit der Ergebnisse. Bereits bei der Erstellung der Standardkurven hat sich durch deren geringe Abweichungen dieser ein hohes Maß an Präzision angedeutet. Diese wurde durch die in Punkt 3.5. beschriebenen Ringversuchen ebenfalls bestätigt, bei denen wir sowohl im November 2015 als auch im Jahr 2016 überdurchschnittlich gut abgeschnitten hatten. Als ein Maß für die Stabilität sind die Versuche von Punkt 3.3. zu werten, bei welchen die einzelnen Allele auch bei mehrfacher Nachtestung ähnliche Ergebnisse ergaben. Dies gilt vor allem bei Werten mit einem Spenderchimärismus von >90%.

Da sich die Ergebnisse auch nach mehrfachem Auftauen der Proben nicht veränderten, ist auch im klinischen Alltag ein hohes Maß an Sicherheit gegeben. So ist hierdurch gewährleistet, dass Proben im weiteren Verlauf nochmals nachgetestet werden können, ohne dass die erweiterten Untersuchungsschritte einen Einfluss auf das Ergebnis haben. Gestützt werden diese Ergebnisse unter anderem durch Arbeiten von R.J. Nederhand et al. und A. Bulla et al., die gezeigt haben, dass die Aufbewahrungsmethode von EDTA-Blut eher eine Auswirkung auf die gewonnene DNA-Menge hat als auf deren Qualität.<sup>[29, 30]</sup>

Hinsichtlich der Verwendung von geringen DNA-Mengen hat sich ein weiterer Vorteil unserer Methode gezeigt. So war es möglich, mit lediglich 10ng/Well ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten. Gerade bei Kleinkindern, bei welchen häufig nur geringe Blutmengen abgenommen werden können, oder bei stark zelldepletierten Patienten hat man somit dennoch die Möglichkeit, den Chimärismusgrad zu bestimmen. Zugleich sollte jedoch bei der Auswertung solcher Proben besonders auf die CT-Werte geachtet werden. Infolge der Verringerung der DNA-Menge kommt es zu einer Erhöhung dieser. Bei mehreren Versuchen ist bereits häufiger beobachtet worden, dass es in sehr späten Zyklen zu spontanen Signalmessungen kommen kann und es somit zu Falsch-Positiven Ergebnissen kommt. Im Zweifelsfall sollten bei ausgesprochen niedrigen DNA-Mengen, die in Punkt 2.2.2. beschriebenen Verfahren angewandt werden.

Ein weiterer Vorteil, der ebenfalls von Alizadeh et al. beschrieben wird, ist der zeitliche Faktor. Alizadeh et al. gaben die Zeit zum Ergebnis mit weniger als 48 Stunden an.<sup>[17]</sup> Durch die routinemäßige Anwendung des Essays in unserem Labor konnten wir diese insoweit reduzieren, als dass Ergebnisse in akuten Fällen bereits am selben Tag angegeben werden konnten. Diese kurze Untersuchungsdauer ist vor allem in der Anfangsphase nach einer allogenen Stammzelltransplantation wichtig, da je nach Krankheitsverlauf Chimärismusuntersuchungen bis zu einmal pro Woche vonnöten sein können.<sup>[28, 31-34]</sup>

Dennoch zeigen sich ebenfalls viele Nachteile der Methode. Eines der größten Probleme stellt die Abnahme der Genauigkeit dar, mit welcher das System bei

immer geringeren Spenderchimärismen misst. Ab einem Wert von <90% kann somit kaum eine valide Aussage getroffen werden. Dies zeigt sich ebenfalls im Rahmen der Ringversuche; so schnitt unser Labor im April 2015 unter anderem deswegen unterdurchschnittlich gut ab, da unter den fünf zu untersuchenden Proben vier Werte von <90% aufwiesen. Aber auch in den anderen Ringversuchen waren unsere Ergebnisse im Bereich dieser Werte am ungenauesten. In Punkt 3.3. zeigte sich im Rahmen der Versuche zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ebenfalls, dass der Essay in diesem Bereich an seine Messgrenzen stößt. So ergaben drei Allele bei all ihren Messungen Werte von über 100%. Schließt man diese aus, so kommt es dennoch zwischen den restlichen Sonden zu übermäßigen Streuungen. Lediglich innerhalb der einzelnen Allele blieben die Messwerte konstant. Somit ist es zumindest theoretisch möglich, bei Verwendung derselben Allele einen Verlaufstrend darzustellen. Jedoch sind die Differenzen zwischen den einzelnen Allelen so groß, dass keinerlei Aussage bezüglich des eigentlichen Chimärismusgrades getroffen werden kann. Wir entschlossen uns letztlich dazu, lediglich anzugeben, dass ein Wert <90% gemessen wurde. Die Ursache liegt in der logarithmischen Zunahme des Messbereichs des Systems. So entspricht z.B. derselbe CT-Bereich den Werten von 0%-90% und von 99%-99,9%. Dies hat somit auch größere Streuungen bei ersterem zur Folge.<sup>[17, 35]</sup>

In der teils sehr starken Abhängigkeit der Ergebnisse von den verwendeten Allelen liegt der nächste Nachteil der Methode. In jedem der oben genannten Versuche waren die Unterschiede der Ergebnisse zwischen den einzelnen Genabschnitten größer als die wiederholten Messungen innerhalb der Allele. Wie zu erwarten, nimmt diese Divergenz mit dem abnehmenden Spenderchimärismus zu. Um nun die Gefahr einer möglichen Fehlmessung so gering wie möglich zu halten, ist es vonnöten stets mehr als eine Sonde zu verwenden. Dies ist wiederum verbunden mit einem höheren Arbeits- und Kostenaufwand.

Auch die starke Abhängigkeit von der Charge des verwendeten Gene-Expression-Master-Mix® stellt eine große Problematik dar. Diese wurde bereits bei der Erstellung der ersten Standardkurven beobachtet, wie in Punkt 3.1.

beschrieben wurde. Eine ungenügend geeignete Master-Mix-Charge kann auch zu den schlechten Ergebnissen im Ringversuch vom April 2015 beigetragen haben. Hierfür spricht das sehr viel bessere Abschneiden in den darauffolgenden Versuchen, nachdem ein Chargenwechsel durchgeführt worden war.

Der letzte Nachteil, der in diesem Punkt aufgeführt werden soll, wird ebenfalls schon von Thiede et al. in Bezug auf die multiplex PRC von STRs beschrieben. So ist es wie in anderen auf DNA basierenden Essays, lediglich möglich, eine Aussage über das Verhältnis von Spender- zu Empfängerzellen zu treffen. Es besteht hierbei keine Information darüber, ob es sich bei den residuellen Empfängerzellen um maligne oder nonmaligne Zellen handelt.<sup>[36]</sup>

#### **4.2. Möglichkeiten zur Verbesserung der Routineuntersuchung**

Auch wenn das Verfahren seit 2013 erfolgreich in unserem Labor angewandt wird, bestehen in Zusammenschau der Ergebnisse der letzten Jahre mehrere Möglichkeiten, um diese Untersuchungsmethode zu verbessern und an die Voraussetzungen des klinischen Alltags anzupassen.

Ein Schwachpunkt unserer Methode liegt darin, dass bei 11,48% aller getesteten Spender-Empfänger-Paare keine passende Allelkombination gefunden werden konnte und somit all diese Chimärismusuntersuchungen in ein externes Labor ausgelagert werden mussten. Dies legt die Lösung nahe, neue Genabschnitte auszutesten und, sofern sich diese für den Einsatz in der Routine eignen, in die Diagnostik zu integrieren. Bereits Ende des Jahres 2014 wurde begonnen, einzelne Patienten auf vier neue Allele (HAI A-C, IMCI A, ICAMI-G, PECAMI-C) auszutesten. Eine endgültige Bewertung dieser steht noch aus und soll nicht im Rahmen dieser Arbeit erfolgen.

Gleichzeitig sollten jedoch auch bereits in der Routine angewandte Allele auf ihren Nutzen hin bewertet werden. Eine Übersicht der verwendeten Allele und gefundenen Spender-Empfänger-Paare lässt sich in Punkt 3.4. betrachten. Auch wenn eine abschließende Bewertung aufgrund der noch zu geringen Datenmenge schwierig ist, lassen sich anhand der Ergebnislage einzelne Trends feststellen. So ist beispielsweise zu erkennen, dass die sechs Allele S01a, S04b, S09b, S10b, S11a und S11b zusammen genommen nur in 14,69%

aller Fälle eine Anwendung finden. Im Vergleich dazu verwendet man das Allel S08a allein in 11,43% und das Allel S07a in 11,22% aller Spender-Empfänger-Paare. Aufgrund der geringen Verwendungsrate dieser sechs Genabschnitte, wäre eine Möglichkeit zur Effizienzsteigerung und auch zur Kosteneinsparung der Wechsel hin zu einem zweizeitigen Vorgehen bei der Austestung der Spender-Empfänger-Paare. Im ersten Schritt könnten diese zunächst auf die 11 Allele untersucht werden, welche in 85,31% eine Anwendung finden. Sofern keine passenden Kombinationen gefunden werden, kann in einem zweiten Schritt auf die sechs verbleibenden Sonden zurückgegriffen werden. Da die Suche nach passenden Allelen im Normalfall bereits vor der eigentlichen Transplantation stattfindet, käme es bei der späteren Routineuntersuchung zu keinerlei Verzögerungen. Ein Ausschluss einzelner Genabschnitte fällt aufgrund der noch zu geringen Datenmenge schwer. So zeigte sich bei drei der sechs Allele (S04b, S09b, S11a) in jeweils 3 Jahren eine Verwendung von weniger als 2%. In jeweils einem Jahr hingegen stieg die Verwendung auf über 5% der Fälle. Dies fiel vor allem im Jahr 2016 bei dem Allel S11a auf. Die Sonden von S10b zeigten in zwei Jahren eine Verwendung von mindestens 5,00%, wohingegen in den beiden anderen Jahren diese mit 1,60% und sogar 0,00% deutlich unter dem Durchschnitt lag. Diese Art der Schwankungen war bei den Allelen S01a und S10b nicht zu beobachten. Letzt genanntes lag während des gesamten Zeitraums stabil um 3,27%. Die Sonden von S01a hingegen wiesen mit einer durchschnittlichen Verwendung von 1,02% und einem Maximum von 2,40% im Jahr 2015 die geringsten Werte aller Allele auf. Somit wäre es lediglich zu diskutieren, ob man das Allel S01a aufgrund seiner zu geringen Verwendung aus dem Assay komplett ausschließt. Alle anderen Allele haben mindestens in einem Jahr eine durchschnittliche Anwendung gefunden und sind somit gut als Backup-Sonden geeignet, sofern kein anderer Genabschnitt für die Untersuchung gefunden werden kann.

Wie bereits oben beschrieben, besteht ein weiteres Problem in der großen Abhängigkeit von der Qualität des verwendeten MasterMixes. Somit liegt es nahe, vor jedem Chargenwechsel mehrere unterschiedliche Chargen

auszutesten, um die jeweils geeignetste auszuwählen und die bestmöglichen Ergebnisse zu erhalten.

### **4.3. Vergleich zwischen quantitativer RT-PCR und STR/VNTR**

Für einen aussagekräftigen Vergleich zwischen unserer Methode und der STR/VNTR-PCR, die den momentanen Goldstandard darstellt, muss der Verlauf des Chimärismus im Anschluss an eine Stammzelltransplantation berücksichtigt werden.

Es handelt sich hierbei nicht um einen statischen, sondern vielmehr um einen dynamischen Prozess, bei dem Patienten zwischen den einzelnen Chimärismusstadien wechseln können.<sup>[31]</sup> So kann ein Empfänger, bei dem lange Zeit ein gemischter Chimärismus nachgewiesen werden konnte, plötzlich einen kompletten Chimärismus aufweisen; ein Vorgang, der auch in die andere Richtung möglich ist.<sup>[31]</sup> Innerhalb des gemischten Chimärismus wurde ebenfalls ein Anstieg und Abfall der autologen Zellbestandteile beobachtet.<sup>[31]</sup>

Laut Bader et al. ist hierbei zu bedenken, dass der Wechsel von einem gemischten Chimärismus hin zu einem Rezidiv überaus schnell vonstattengehen kann und somit regelmäßige Kontrollen essenziell für eine gute Nachsorge sind.<sup>[31]</sup> All diese Punkte bedingen, dass die Aussagekraft eines einzelnen Wertes, wie bei vielen anderen klinischen Untersuchungsmethoden, nur eine eingeschränkte Wertigkeit besitzt. Erst in Zusammenschau mehrerer Ergebnisse kann ein Verlauf abgebildet und eine verlässliche Aussage getroffen werden.

Gestützt wird dies durch eine Arbeit von Khan et al., die besagt, dass zwar ein niedriger Anteil an residuellen Zellen nicht mit einem höheren Risiko eines Rezidivs einer leukämischen Erkrankung verbunden ist, jedoch ein Anstieg von Empfängerzellen, sprich ein progressiver oder ansteigender gemischter Chimärismus, ein Rezidiv ankündigen kann.<sup>[15]</sup> Dies scheint vor allem in T-Zell-depletierten Transplantaten der Fall zu sein.<sup>[15]</sup>

Stellt man nun diese beiden Untersuchungsmethoden gegenüber, liegt der wohl größte Unterschied in der Sensitivität der beiden Verfahren. Gemäß Khan et al. wird diese bei der STR-Untersuchung mit 0,4-5% angegeben, wohingegen die Sensitivität der quantitativen RT-PCR mit 0,1% beschrieben wird.<sup>[15]</sup> Auch wenn

dieser Wert ebenfalls von unserem Labor als Nachweisgrenze angegeben wird, konnten wir aufzeigen, dass abgesehen von Allel S11a eine Sensitivität von bis zu 0,01% möglich ist. Gleichzeitig konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass die Messgenauigkeit bei einem zunehmenden Empfängerchimärismus in dem Maße abnimmt, dass genaue Aussagen bei Werten von >10% nicht mehr getroffen werden können. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen von Alizadeh et al. und Maas et al., die einen Variationskoeffizient von 30-50% bei dieser Methode beschrieben haben.<sup>[17, 31, 37]</sup> Demgegenüber steht ein Variationskoeffizient von lediglich 5% bei der STR-Methode, der es erlaubt, auch in Bereichen mit einem Empfängerchimärismus von >10% genaue Messungen durchzuführen.<sup>[31]</sup> Durch diese Eigenschaften ist die STR-Methode der quantitativen RT-PCR bei der Kontrolle des gemischten Chimärismus, der bei einem Spenderzellanteil zwischen 10-90% besteht, deutlich überlegen.<sup>[38]</sup> Bei der Beobachtung des Mikrochimärismus hingegen ist die quantitative RT-PCR deutlich im Vorteil und stellt laut Alidazeh et al. die beste Nachweismethode für dieses Chimärismusstadium dar.<sup>[17]</sup>

Berücksichtigt man nun die oben genannte Dynamik des Chimärismus, so leitet sich zusätzlich ab, dass Patienten, deren Werte sich von einem kompletten Chimärismus hin zu einem gemischten Chimärismus verändern, bzw. bei denen es zu einem increasing-Mixed-Chimerism kommt, durch unser Verfahren deutlich früher auffällig werden.<sup>[17, 26-28]</sup> Dies hat insofern Bedeutung, als dass gezeigt werden konnte, dass Patienten mit einer solchen Dynamik ein deutlich erhöhtes Rezidivrisiko haben.<sup>[17, 31, 33, 39]</sup> Somit können auch nötige Behandlungsschritte rechtzeitig ergriffen werden. Diese umfassen je nach Patient eine Reduktion der Immunsuppression, weitere Chemotherapien, DLI-Gaben oder auch eine erneute allogene Stammzelltransplantation.<sup>[33, 40-42]</sup> Zudem werden aktuell Studien mit Checkpoint-Inhibitoren durchgeführt.<sup>[43, 44]</sup> Unabhängig von der weiteren Behandlung sind auch in dieser Phase weitere Chimärismusuntersuchungen vonnöten.<sup>[40]</sup> Patienten, die jedoch von Beginn an einen gemischten Chimärismus mit erhöhtem Empfängerzellanteil aufweisen, können durch die quantitative RT-PCR nur unzureichend kontrolliert werden.

Ein Vorteil, der gerade in der Routinediagnostik zu Tragen kommt, besteht in dem geringeren Zeitaufwand, den die RT-PCR benötigt. So kann eine Blutprobe, nachdem die zu untersuchenden Allele festgelegt wurden, in ca. 3-4 Stunden kontrolliert werden. Dies ermöglicht es, in akuten Fällen Proben noch am selben Tag zu bearbeiten oder die Frequenz der Untersuchungen insoweit zu steigern, als dass ein genauer Verlauf des Chimärismus aufgezeichnet werden kann. Zusätzlich können auf diese Weise Proben, bei denen die Untersuchung fehlerhaft war oder deren Ergebnisse unklar waren, auf einfache Art nachgeprüft werden. Im Gegensatz dazu ist die STR-PCR zeit- und arbeitsaufwendiger.<sup>[45, 46]</sup>

Ein deutlicher Nachteil besteht in der Möglichkeit der Anwendung. Im Gegensatz zur STR-PCR-Methode, die bei beinahe 100% aller Spender-Empfänger-Paare angewandt werden kann, ist dies mit der quantitativen RT-PCR Methode bei ca. 10% nicht möglich, da die Spenderzellen nicht von denen der Empfänger unterschieden werden können.<sup>[17, 31]</sup> Diese Angabe entspricht unseren Ergebnissen, da wir, wie bereits erwähnt, bei 11,48% aller Spender-Empfänger Paare keine passende Allelkombination ausfindig machen konnten. Wir erhoffen uns, durch die Einbringung neuer Genabschnitte diesen Wert weiter senken zu können.

Ein großer Nachteil, der bei beiden Verfahren besteht, liegt im Unvermögen, gesunde von malignen Zellen zu unterscheiden.<sup>[31]</sup> Einerseits gibt es jedoch mittlerweile genügend empirische Daten, mit deren Hilfe ein genaues Vorgehen anhand der Verläufe des Chimärismus festgelegt werden kann. Beispielsweise sind häufig gesunde hämatopoetische Zellen des Empfängers für einen frühen gemischten Chimärismus verantwortlich, demgegenüber liegen einem schnellen Anstieg eines gemischten Chimärismus häufig maligne Zellen zu Grunde.<sup>[15, 31]</sup> Andererseits ist es in der Klinik die Regel, sich nicht nur alleine auf die Chimärismusuntersuchung zu verlassen, sondern gleichzeitig weitere Untersuchungen durchzuführen, mit deren Hilfe eine genauere Aussage über die Zellverhältnisse getroffen werden kann. Zu nennen wären hierbei exemplarisch das Differenzialblutbild, mechanisch oder per Hand, oder auch zytogenetische oder molekulargenetische Untersuchungen.<sup>[5, 47]</sup>

Zusammenfassend erkennt man also, dass beide Verfahren in ihren jeweiligen Messbereichen zuverlässige und genaue Ergebnisse bringen und somit verlässliche Chimärismuskachweise ermöglichen.<sup>[35]</sup> Die höhere Sensitivität der RT-PCR und somit auch die Möglichkeit, ein Rezidiv früher zu erkennen, räumt diesem Verfahren seine Berechtigung in der täglichen Routine ein.<sup>[17, 35]</sup> Lediglich bei Patienten, bei denen ein hoher gemischter Empfängerchimärismus von über 10% vorhanden ist, wäre eine Möglichkeit der Optimierung ein Wechsel hin zum STR/VNTR-Nachweis, da dieser gerade in solchen Bereichen bessere Ergebnisse liefert.<sup>[35]</sup> Dies entspräche demselben Procedere, wie es bereits am Anfang der hausinternen Chimärismusuntersuchung durchgeführt wurde.

#### **4.4. MRD-Diagnostik und neue Untersuchungsmethoden**

In den letzten Jahren wurde in der Literatur mehrfach die digitale PCR als mögliche Alternative zur STR-Methode und quantitativen RT-PCR genannt. Diese soll gemäß Stahl et al. die Stärken der beiden Methoden, nämlich die Sensitivität der quantitativen RT-PCR und die Zuverlässigkeit der STR-Methode, miteinander verbinden.<sup>[38]</sup> So lässt die Genauigkeit dieser Untersuchung erst im Bereich eines Donorchimärismus von 20-30% so stark nach, dass der Fehler relevant wird.<sup>[38]</sup> Dieser kann jedoch weiter vermindert werden, indem nicht nur die Donorzellen, sondern auch die des Rezipienten quantifiziert werden.<sup>[38]</sup> Selbst ohne diesen weiteren Schritt ist der Bereich, der zuverlässig untersucht werden kann, im Vergleich zu unserer hausinternen Methode bedeutend größer. Waterhouse et. al. zeigten, dass die Sensitivität der dPCR ebenfalls höher ist als die konventionelle STR-Methode und somit auch ein fragliches Rezidiv früher erkannt werden kann.<sup>[27, 48]</sup> In derselben Arbeit wurde die Sensitivität mit  $10^{-4}$  angegeben und entspricht somit auch der Nachweisgrenze unserer hausinternen Methode.<sup>[48]</sup> Dennoch zeigte sich im direkten Vergleich der dPCR mit der qPCR ein früherer Rezidivnachweis durch die dPCR-Methode.<sup>[26, 27]</sup> Die Häufigkeit der Anwendungsmöglichkeit der dPCR ist mit 95-99% aller Spender-Empfänger-Paare höher als bei der In-House-Methode.<sup>[38]</sup> Ein weiteres Vorteil, den diese Methode mit sich bringt, ist die einfachere Handhabung; so ist es zum Beispiel nicht mehr nötig, für die

Quantifizierung der Ergebnisse Standardkurven herzustellen.<sup>[27, 38, 49]</sup> Zusammengefasst handelt es sich bei der dPCR Methode um eine höchst sensitive und akkurate Untersuchungsmethode, die viele Nachteile der RT-PCR nicht aufweist. Gemäß Waterhouse et al. ist die dPCR, gerade in Kombination mit der unten genannten MRD-Diagnostik, eine sensitive und genaue Methode, um den molekularen Remissionsstandes eines allogenen stammzell-transplantierten Patienten darzustellen.<sup>[50]</sup> Somit wäre zu überlegen, ob ein Wechsel hin zu diesem System stattfinden sollte, sobald es sich endgültig etabliert hat.

Neben der dPCR gab es zudem einen neuen qrtPCR-Ansatz, der auf einem Nachweis von Insertion-Deletions-Polymorphismen (INDEL-Polymorphismen) und Null-Allelen basiert.<sup>[26, 27]</sup> Bei letzteren handelt es sich um Genabschnitte, die im Genom entweder vorhanden oder abwesend sind.<sup>[26]</sup> Bei dieser Methode wird eine Sensitivität von  $10^{-4}$  bis  $10^{-5}$  beschrieben.<sup>[26]</sup> Da hierbei ebenfalls eine RT-PCR durchgeführt wird und sie somit auf demselben Prinzip basiert, wäre eine Implementierung in unsere Methode zu überlegen. Somit wäre es gegebenenfalls möglich, Patienten in-House zu untersuchen, bei denen unsere Methode aufgrund fehlender Sonden nicht möglich ist.

Eine weitere Nachweismethode für maligne Zellen ist die sogenannte MRD-Untersuchung (Minimal residual disease). Sie weist ebenfalls eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität auf.<sup>[39]</sup> Bei dieser Untersuchung werden krankheitsspezifische DNA-Alternationen bzw. Mutationen (e.g. WT-1, JAK2-V617F, NPM-1, FLT-3) genutzt, die mittels (RT-) PCR nachgewiesen werden.<sup>[34, 39, 51, 52]</sup> Somit kann auch mit Hilfe dieser Methodik ein drohendes Rezidiv frühzeitig erkannt werden.<sup>[53]</sup> Eine mögliche Schwäche der MRD Diagnostik ist jedoch die geringe Anzahl an zu untersuchenden Genloki. Zudem wurde bei der Untersuchung von TCR-Genen (T-Cell Receptor) beschrieben, dass es zwischen Diagnose und Rezidiv zu weiteren Mutationen der Genloki kommen kann und es somit zu falsch negativen Ergebnissen kommt.<sup>[39]</sup> Aufgrund der hohen Sensitivität ist die MRD-Diagnostik in den Fällen, in denen sie durchgeführt werden kann, eine sinnvolle ergänzende Untersuchung. Unter

anderem kann sie auch mit einer Chimärismusuntersuchung einer Subpopulation kombiniert werden.<sup>[51]</sup>

#### **4.5. Kritische Betrachtung der T-Zell-Chimärismus-Untersuchung**

Die Möglichkeit, den Chimärismusgrad der CD3<sup>+</sup> Zellen zu bestimmen, stellt aufgrund der Schlüsselrolle, die diese im Rahmen der allogenen Stammzelltransplantation einnehmen, einen großen Nutzen im klinischen Alltag dar.

So wird vor allem bei Patienten mit einem erhöhten Abstoßungsrisiko zu regelmäßigen Kontrollen dieser Subpopulation geraten.<sup>[34]</sup> Bereits zwei Wochen nach Transplantation können so drohende Abstoßungsreaktionen registriert werden.<sup>[34]</sup> Zu dem bedrohten Patientenkontingent gehören u.a. Patienten mit einer schweren aplastischen Anämie, Patienten, die ein T-Zell-depletiertes Transplantat erhalten haben oder auch Patienten, die von einem nicht passenden Spender oder auch von einem haploidenten Spender transplantiert wurden.<sup>[34]</sup> Gerade bei letzterem ist anzumerken, dass diese Patienten v.a. ein T-Zell-depletiertes Transplantat erhalten bzw. die T-Zell-Depletion nach der Transplantation z.B. durch Gabe von Cyclophosphamid stattfindet.<sup>[5]</sup>

Zudem kann anhand der Entwicklung des T-Zell-Chimärismus das Risiko eines Rezidivs bzw. eines Voranschreitens der Grunderkrankung abgeschätzt werden.<sup>[54, 55]</sup> Gemäß Absi et al. korreliert ein T-Zell-Chimärismus von mehr als 25% an Tag +30 nach Transplantation mit einem schlechteren PFS (progression free survival).<sup>[54]</sup> Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Le Bris et al., in deren Arbeit ein gemischter T-Zell-Chimärismus an Tag +90 mit einem längeren Overall Survival korreliert.<sup>[55]</sup> Als möglicher Grund hierfür wird der höhere Gehalt an restlichen T-Gedächtniszellen angegeben.<sup>[55]</sup>

Des Weiteren wurden Zusammenhänge zwischen den T-Zell-Chimärismus-Stadien und dem Auftreten einer GvHD beschrieben. So korrelieren sowohl ein steigender CD34<sup>+</sup>-Gehalt als auch ein sinkender gemischter Chimärismus der CD3<sup>+</sup> Zellen mit einem höheren Risiko, eine akute GvHD zu entwickeln.<sup>[24]</sup> In Bezug auf die chronische GvHD zeigte sich, dass das Vorhandensein von Empfänger-T-Zellen zwei Monate nach Transplantation das Auftreten dieser reduziert.<sup>[25]</sup> Trotz all dieser Zusammenhänge sollte gemäß Mossallam et al.

stets beachtet werden, dass die Untersuchung des T-Zell-Chimärismus eher prognostisch bedeutsam ist, nicht jedoch diagnostisch.<sup>[25]</sup>

Dennoch dient die Untersuchung des T-Zell Chimärismus aufgrund all dieser komplexen Zusammenhänge dazu, die individuelle Therapie des Patienten weiter zu optimieren, indem frühzeitig die Immunsuppression angepasst werden kann bzw. weitere Behandlungsschritte eingeleitet werden können.<sup>[40]</sup>

Vor der Einführung der Untersuchung der CD3<sup>+</sup>-Zellen in der Routine wurden die in Punkt 3.6. beschriebenen Versuche durchgeführt, um sicherzustellen, dass dies auch mit der quantitativen RT-PCR möglich ist. In der ersten Versuchsreihe wurden hierfür vier künstliche T-Zell-Chimärismen mit einer 10%igen, 0,1%igen und 0,01%igen Verdünnung mit 14 verschiedenen Sonden untersucht. Zunächst zeigte sich, dass von den 42 untersuchten Proben 41 ausgewertet werden konnten. Lediglich eine 0,01%ige Verdünnung, die mit dem Allel S11a untersucht wurde, lieferte keine Ergebnisse. Bei genauerer Betrachtung der Werte war jedoch erkennbar, dass bei allen Verdünnungen die durchschnittlichen Ergebnisse höher waren als erwartet. Dadurch, dass die Werte bei allen vier erstellten Proben zu hoch waren, ist es unwahrscheinlich, dass dies auf eine Fehlverteilung der T-Zellen zurückzuführen ist. Als mögliche Erklärung wurde ein zusätzliches Signal der restlichen PBMCs angenommen, die trotz T-Zell-Isolation weiterhin in den Proben vorhanden waren. Folglich wurde hieraufhin versucht, diese Restsignale aus dem Ergebnis zu entfernen, was mittels der ebenfalls in Punkt 3.6. genannten Erweiterungen der Untersuchung ermöglicht wurde. Dies hatte gleichzeitig den Effekt, genauere Werte zu erhalten. Zur Kontrolle wurden nochmals zwei Proben erstellt, die einen künstlichen T-Zell-Chimärismus von 10% und 0,1% aufwiesen. Hierbei zeigte sich jedoch, dass die Ergebnisse zwischen den beiden Proben sehr starke Differenzen aufwiesen. So lagen die Mittelwerte bei der 10%igen Verdünnung bei  $8,43\% \pm 2,86\%$  versus  $21,78\% \pm 6,89\%$  und bei der 0,1%igen Verdünnung bei  $0,12\% \pm 0,06\%$  und  $0,21\% \pm 0,07\%$ . Als Ursache hierfür wurde eine ungleiche Verteilung der T-Zellen bei Erstellung der künstlichen Chimärismen gesehen, was die Aussagekraft dieser Versuche stark mindert. Durch Nachtestung mehrerer Sonden wurde ausgeschlossen, dass es sich bei

den Ergebnissen um zufällige, falsch erhöhte Signale handelte. Dennoch konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die zusätzlichen Signale der PBMCs zu isolieren und aus dem Ergebnis zu entfernen. So machten diese bei den Proben mit dem 10%igen Chimärismus im Durchschnitt  $1,58\% \pm 0,69\%$  und bei den 0,1%igen Proben  $0,02\% \pm 0,01\%$  vom ursprünglichen Ergebnis aus. Zusätzlich konnte durch die Versuche erkannt werden, dass der Essay durch die weitere Bearbeitung der Proben keine Senkung der Sensitivität erfährt und somit grundsätzlich in der Routine einsetzbar war.

Eine Problematik, die sich bei der Einführung zeigte, war der geringere Zellgehalt, der durch die Bearbeitung der Proben entstand. Von den ca. 5000 Leukozyten pro  $\mu\text{l}$  Blut machen Lymphozyten nur etwa 20% aus und diese teilen sich nochmals auf in B-Lymphozyten (15%), T-Lymphozyten (75%) und NK-Zellen (10%).<sup>[56]</sup> Somit wird durch die T-Zell-Isolation der Zellgehalt und folglich auch die gewonnene DNA-Menge deutlich reduziert. Um die daraus folgende geringere DNA-Ausbeute zu erhöhen, war es nötig, die zu untersuchende Blutmenge auf 18ml pro Patienten zu erhöhen. Dieser Schritt in Verbindung mit dem abgewandelten Isolationsverfahren hatte zur Folge, dass lediglich drei von insgesamt 128 Proben (2,34%) nicht untersucht werden konnte, da zu wenig Zellmaterial vorhanden war. Zusätzlich hierzu kommen jedoch noch sieben weitere Proben, bei denen aufgrund einer zu niedrigen Zellkonzentration keine FACS-Untersuchung möglich war und somit auch die Signale der PBMCs nicht abgezogen werden konnten. Im Vergleich zur normalen Chimärismusuntersuchung kommt es somit bei dem T-Zell-Chimärismus häufiger zu nicht auswertbaren Proben. Jedoch gilt es bei diesen Ergebnissen, den chronologischen Verlauf zu beachten. So traten die oben genannten Probleme vor allem im Jahr 2014 auf und besserten sich deutlich in den Jahren 2015/16 bis zu dem Punkt, dass 2016 alle eingeschickten Proben ausgewertet werden konnten. Als mögliche Ursache hierfür kommt ebenfalls die ungeeignete Charge des Master-Mix in Frage, welche im Jahr 2014 Anwendung gefunden hat. Andere Ursachen, wie eine bessere/genauere Erstellung der Standardkurven, sind hierbei ebenfalls in Betracht zu ziehen.

Ein weiteres Problem zeigt sich bei der Berechnung des endgültigen Ergebnisses. So ergaben 17 Proben (13,28%) einen Empfängerchimärismus von unter 0,00%. Diese Problematik trat unabhängig vom gemessenen Chimärismusgrad vor Subtraktion auf. Ebenso wie in den anderen Versuchen ist auch hier eine deutliche Verbesserung der Ergebnisse zu sehen, wenn das Jahr 2014 mit den Jahren 2015/2016 verglichen wird.

In diesem Kontext gilt es auch die PBMC-Werte zu betrachten, die während der Untersuchungen gemessen und abgezogen wurden. So waren diese, mit Ausnahme der Werte im Bereich von  $<0,1\%$ , im Jahr 2014 deutlich höher als in den beiden darauffolgenden Jahren. Jedoch ist der prozentuale Anteil der PBMCs, sogar mit Inklusion der Ergebnisse des Jahres 2014, äußerst gering. Somit stellt sich die Frage, inwieweit ein Nutzen besteht diese Werte bei einer Methode zu berechnen, die einen Variationskoeffizienten von 30-50% aufweist.<sup>[17]</sup>

Erschwerend zu der technischen Realisierbarkeit und der damit verbundenen Hindernisse kommt die Dynamik des T-Zell-Chimärismus hinzu. So zeigte sich bei Auswertung der Ergebnisse aus den Jahren 2014-2016, dass ein Großteil der Ergebnisse einen T-Zell-Chimärismus (Donorchimärismus) von  $<90\%$  aufwies. Hierbei muss jedoch bedacht werden, dass es zu einer Verfälschung der Untersuchungshäufigkeit gekommen ist. So wurden Patienten, die ein solches T-Zell Verhältnis hatten, sehr viel häufiger nachgetestet als Patienten, die einen kompletten T-Zell-Chimärismus aufwiesen. Jedoch auch unabhängig von unseren Ergebnissen zeigt sich gerade bei dosisreduzierten Konditionierungsprotokollen ein deutlich verlängerter gemischter T-Zell-Chimärismus.<sup>[57, 58]</sup>

Zusammen gefasst lässt sich somit sagen, dass die Untersuchung des T-Zell Chimärismus wichtig für die Prognose einzelner Patienten ist. Mit unserer hausinternen Methode gelingt es, einen Verlauf des T-Zell-Chimärismus darzustellen. Wie bereits mehrfach diskutiert, stellt gerade der Bereich mit einem Donorchimärismus von  $>10\%$  ein Problem dar. Hinzu kommt die Komplexität der Methode, aufgrund derer die Fragestellungen genau zu

überprüfen sind. Gegebenenfalls muss die Untersuchung dieser angepasst werden.

#### **4.6. Weitere Anwendungsmöglichkeiten der quantitativen RT-PCR**

Ebenso wie bei der Untersuchung nach T-Zellen ist es möglich, den Assay so abzuändern, um damit weitere Subpopulationen analysieren zu können.

Als eine der interessantesten Gruppen gelten hierbei die CD34<sup>+</sup>-Zellen. Gemäß Thiede et al. kann man anhand dieser -ähnlich wie bei den T-Zellen auch- ein Rezidiv sehr viel früher erkennen als bei einer bloßen Untersuchung der peripheren Leukozyten.<sup>[36]</sup> Der Zusammenhang zwischen dieser Zellpopulation und dem Rezidiv sind vor allem bei Patienten zu erkennen, die an einer ALL oder AML leiden.<sup>[31, 59]</sup> Der Grund hierfür ist, dass ein Großteil der malignen Zellen bei diesen Erkrankungen CD34 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren.<sup>[32, 60]</sup> Das bedeutet, dass diese Zellgruppe frühzeitig in der Chimärismusuntersuchung auffällt.<sup>[32, 60]</sup> Es gilt jedoch zu beachten, dass bei malignen Erkrankungen stets Mutationen vorkommen können und so ist auch ein Verlust von CD34 möglich.<sup>[60]</sup> Jedoch hat sich auch gezeigt, dass in Bezug auf Mutationen eine neue CD34 Expression häufiger ist als ein CD34-Verlust.<sup>[60]</sup> Somit würde eine Erweiterung der Analyse hin zu den hämatologischen Stammzellen einen großen Nutzen bringen, sei es eigenständig oder auch in Kombination mit der Untersuchung der T-Zellen. Das größte Problem hierbei wäre jedoch die geringe Anzahl der CD34<sup>+</sup>-Zellen, die nur ca. 0,1% aller peripheren Leukozyten ausmachen.<sup>[36]</sup> Es konnte zwar gezeigt werden, dass die Untersuchung des CD34-Chimärismus im peripheren Blut möglich ist und ihren Nutzen mit sich bringt, jedoch ist die technische Realisierbarkeit mittels der in-House-Methode fraglich, da hierfür große Mengen an peripherem Blut vonnöten wären.<sup>[32]</sup> Zur Klärung der Realisierbarkeit des CD34-Chimärismus müssten jedoch weitere Versuche angestrebt werden. Zudem könnte ebenfalls eine Untersuchung des Knochenmarks diskutiert werden, da in diesem der CD34-Gehalt natürlicherweise höher ist als im peripheren Blut und es somit einfacher wäre, eine Mindestmenge an zu untersuchenden Leukozyten zu erhalten.<sup>[61]</sup> Dennoch handelt es sich zusammenfassend um eine hochspezielle Untersuchung, die am ehesten bei Hochrisikopatienten in Frage käme.

Neben den hämatologischen Stammzellen wären auch Untersuchungen von anderen Subpopulationen von Interesse. Exemplarisch sollen in dieser Arbeit noch NK-Zellen und Monozyten hervorgehoben werden.

Bei NK-Zellen wurde ein Zusammenhang zwischen einem gemischten Chimärismus und dem Rezidiv einer leukämischen Erkrankung beschrieben.<sup>[31, 62]</sup> Interessanterweise ist dies nur bei pädiatrischen Patienten der Fall und nicht bei Erwachsenen.<sup>[31, 62]</sup> Speziell in Bezug auf ALLs konnte gezeigt werden, dass ein sinkender Donor-NK-Zell-Chimärismus prädiktiv für ein Rezidiv ist.<sup>[63]</sup> Zudem können Untersuchungen der CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup> NK-Zellen dazu dienen, frühe Abstoßungsreaktionen zu erkennen.<sup>[53]</sup> Somit kann eine frühzeitige Kontrolle der NK-Zellen zum Monitoring des Engraftments bei Hochrisikopatienten angewandt werden.<sup>[53]</sup>

Ein gesteigerter Anteil an Donor-Monozyten geht gemäß Arpinati et al. mit einer chronischen GvHD einher.<sup>[64]</sup> Somit könnten durch die Bestimmung des genauen Monozytenchimärismus Patientengruppen ausgemacht werden, die ein hohes Risiko für eine Entwicklung einer chronischen GvHD haben. Bei diesen könnte beispielsweise die Reduktion der Immunsuppression besser angepasst werden.

Allein Anhand dieser Beispiele ist bereits die Vielfalt der Anwendungsgebiete und die Bedeutung der Untersuchung der einzelnen Subpopulationen zu erkennen. Eine gezielte Untersuchung spezieller Subpopulationen in Abhängigkeit von der zugrunde liegenden Erkrankung scheint aktuell vielversprechend und könnte dabei helfen, mögliche Rezidive bzw. Abstoßungsreaktionen frühzeitig zu erkennen.<sup>[63]</sup>

Da all diese Untersuchungen darauf abzielen, mögliche Folgen so früh als möglich zu erkennen, scheint hierbei auch die RT-PCR mit ihrer hohen Sensitivität als scheinbar überlegene Untersuchungsmethode in Frage zu kommen.<sup>[65]</sup>

## 5. Zusammenfassung

Zusammengefasst zeigte sich, dass sich die Chimärismusuntersuchung mittels RT-PCR dazu eignet, in der klinischen Routine angewandt zu werden. Dies wurde uns durch die oben genannten Ringversuche wiederholt bestätigt. Mit Hilfe unserer Anpassungen in der klinischen Diagnostik konnten im Verlauf beinahe alle Proben, bei denen eine Allelkombination gefunden wurde, in-House verwertet werden. Durch das hohe Maß an Sensitivität, das mit dieser Methode einhergeht, ist sie gerade bei der Betrachtung des Mikrochimärismus der klassischen STR/VNTR-Untersuchung überlegen.<sup>[17]</sup> Dennoch zeigte sich auch die weiterhin bestehende Schwäche der Untersuchungsmethode bei Spenderchimärismen von <90%.<sup>[17]</sup> In diesen Bereichen wäre zu überdenken, ob bei Hochrisikopatienten eine externe Zweitmeinung eingeholt werden sollte, um einen besseren Verlauf darzustellen. Im direkten Vergleich mit der neuen dPCR zeigte sich unser Verfahren als deutlich unterlegen, wie in Punkt 4.4 eindeutig aufgezeigt wurde.<sup>[27, 50]</sup> Somit sollte darüber diskutiert werden, ob in den kommenden Jahren ein Wechsel hin zu dieser neuen Methodik vollzogen werden sollte.

Bezüglich der Untersuchung des T-Zell-Chimärismus zeigte sich ebenfalls, dass dieser seine Anwendung in der Routine findet. Ein Hauptproblem, das sich hierbei zeigte, war die Häufung der hohen mixed-Chimerism-Werte. Somit ist es schwierig, in diesen Fällen genaue Verläufe darzustellen.

Dennoch konnte gezeigt werden, dass eine Untersuchung einer Zell-Subpopulation möglich ist. Somit bietet dieses Verfahren die Möglichkeit, ein weiteres und breiteres Anwendungsspektrum bei der Untersuchung von CD34+ Zellen oder NK-Zellen zu finden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Appelbaum, F.R., *Hematopoietic-cell transplantation at 50*. N Engl J Med, 2007. **357**(15): p. 1472-5.
2. Copelan, E.A., *Hematopoietic Stem-Cell Transplantation*. New England Journal of Medicine, 2006. **354**(17): p. 1813-1826.
3. Passweg, J.R., et al., *Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually*. Bone Marrow Transplant, 2016. **51**(6): p. 786-92.
4. Marks, R. and J. Finke, *[The impact of stem cell therapy in hematology and oncology]*. Internist (Berl), 2006. **47**(5): p. 467-8, 470-8.
5. Berger, D.P. and R. Mertelsmann, *Das Rote Buch: Hämatologie und Internistische Onkologie*. 6., überarbeitete und erweiterte Auflage ed. 2017: ecomed Medizin.
6. Aversa, F., et al., *Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype*. N Engl J Med, 1998. **339**(17): p. 1186-93.
7. Lake, R.A. and B.W. Robinson, *Immunotherapy and chemotherapy--a practical partnership*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(5): p. 397-405.
8. Wiesneth, M., *Gewinnung und Präparation von peripheren Blutstammzellen*, in *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen – Therapie – Methodik*, V. Kiefel and C. Mueller-Eckhardt, Editors. 2011, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 245-260.
9. Sack, U., A. Tárnok, and G. Rothe, *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie.*: Karger Medical and Scientific Publishers.
10. Pfitzmann, R. and P. Redaktion. *Graft-versus-Host-Reaktion*. 2017 05.2017; Available from: <https://www.pschyrembel.de/Graft-versus-Host-Reaktion/K0939>.
11. Tivol, E., R. Komorowski, and W.R. Drobyski, *Emergent autoimmunity in graft-versus-host disease*. Blood, 2005. **105**(12): p. 4885-91.
12. Marmont, A., et al., *T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia*. Blood, 1991. **78**(8): p. 2120-2130.
13. Hesoid., *Theogenie oder Der Götter und Göttinnen Geschlecht*. 1911.
14. Beck, M., *Mensch-Tier-Wesen, zur ethischen Problematik von Hybriden, Chimären, Perthenoten*. 2009.
15. Khan, F., A. Agarwal, and S. Agrawal, *Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme*. Bone Marrow Transplantation, 2004. **34**(1): p. 1-12.
16. Schaap, N., et al., *Red blood cell phenotyping is a sensitive technique for monitoring chronic myeloid leukaemia patients after T-cell-depleted bone marrow transplantation and after donor leucocyte infusion*. British Journal of Haematology, 2000. **108**(1): p. 116-125.
17. Alizadeh, M., et al., *Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction*. Blood, 2002. **99**(12): p. 4618-25.
18. Garibyan, L. and N. Avashia, *Polymerase chain reaction*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(3): p. 1-4.

19. Deepak, S., et al., *Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes*. *Curr Genomics*, 2007. **8**(4): p. 234-51.
20. Arya, M., et al., *Basic principles of real-time quantitative PCR*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2005. **5**(2): p. 209-19.
21. VanGuilder, H.D., K.E. Vrana, and W.M. Freeman, *Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis*. *Biotechniques*, 2008. **44**(5): p. 619-26.
22. *TaqMan® GeneExpression Assay Solutions*. 2018 Available from: <http://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/taqman-gex-brochure.pdf>
23. Universitätsklinikum Würzburg and M.K.u.P. II. *Zentrum für allogene Stammzelltherapien*. Available from: <https://www.ukw.de/medizinische-klinik-ii/zentrum-fuer-allogene-stammzelltherapien/startseite/>.
24. Rupa-Matysek, J., et al., *Correlation between the kinetics of CD3+ chimerism and the incidence of graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. *Transplant Proc*, 2011. **43**(5): p. 1915-23.
25. Mossallam, G.I., et al., *Prognostic utility of routine chimerism testing at 2 to 6 months after allogeneic hematopoietic cell transplantation*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2009. **15**(3): p. 352-9.
26. Jiménez-Velasco, A., et al., *Reliable quantification of hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation for acute leukemia using amplification by real-time PCR of null alleles and insertion/deletion polymorphisms*. *Leukemia*, 2005. **19**(3): p. 336-343.
27. Valero-Garcia, J., et al., *Earlier relapse detection after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation by chimerism assays: Digital PCR versus quantitative real-time PCR of insertion/deletion polymorphisms*. *PLoS One*, 2019. **14**(2): p. e0212708.
28. Bader, P., et al., *Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavorable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem-cell transplantation: possible role for pre-emptive immunotherapy?* *J Clin Oncol*, 2004. **22**(9): p. 1696-705.
29. Bulla, A., et al., *Blood DNA Yield but Not Integrity or Methylation Is Impacted After Long-Term Storage*. *Biopreserv Biobank*, 2016. **14**(1): p. 29-38.
30. Nederhand, R.J., et al., *Logistics and quality control for DNA sampling in large multicenter studies*. *J Thromb Haemost*, 2003. **1**(5): p. 987-91.
31. Bader, P., et al., *How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation?* *Bone Marrow Transplantation*, 2005. **35**(2): p. 107-119.
32. Bornhauser, M., 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): p. 1613-7.
33. Platzbecker, U., et al., *Azacitidine for treatment of imminent relapse in MDS or AML patients after allogeneic HSCT: results of the RELAZA trial*. *Leukemia*, 2012. **26**(3): p. 381-9.

34. Bader, P., et al. *Monitoring, Chimärismusanalysen und Bestimmung der minimalen Resterkrankung (MRD): Allogene Stammzelltransplantation*. 2018 10/2018; Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/monitoring-chimaerismusanalysen-und-bestimmung-der-minimalen-resterkrankung-mrd/@@view/html/index.html>.
35. Tyler, J., et al., *Personalized Chimerism Test that Uses Selection of Short Tandem Repeat or Quantitative PCR Depending on Patient's Chimerism Status*. *J Mol Diagn*, 2019. **21**(3): p. 483-490.
36. Thiede, C., et al., *Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers*. *Leukemia*, 2001. **15**(2): p. 293-302.
37. Maas, F., et al., *Quantification of donor and recipient hemopoietic cells by real-time PCR of single nucleotide polymorphisms*. *Leukemia*, 2003. **17**(3): p. 621-629.
38. Stahl, T., et al., *Digital PCR Panel for Sensitive Hematopoietic Chimerism Quantification after Allogeneic Stem Cell Transplantation*. *Int J Mol Sci*, 2016. **17**(9).
39. Kroger, N., et al., *NCI First International Workshop on the Biology, Prevention, and Treatment of Relapse after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: report from the Committee on Disease-Specific Methods and Strategies for Monitoring Relapse following Allogeneic Stem Cell Transplantation. Part I: Methods, acute leukemias, and myelodysplastic syndromes*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2010. **16**(9): p. 1187-211.
40. Zeiser, R., et al. *Rezidiv: Prävention und Behandlung: Allogene Stammzelltransplantation*. 2018 01.2018; Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/rezidiv-praevention-und-behandlung/@@view/html/index.html>.
41. Deol, A. and L.G. Lum, *Role of donor lymphocyte infusions in relapsed hematological malignancies after stem cell transplantation revisited*. *Cancer Treat Rev*, 2010. **36**(7): p. 528-38.
42. Christopheit, M., et al., *Second allograft for hematologic relapse of acute leukemia after first allogeneic stem-cell transplantation from related and unrelated donors: the role of donor change*. *J Clin Oncol*, 2013. **31**(26): p. 3259-71.
43. Herbaux, C., et al., *Efficacy and tolerability of nivolumab after allogeneic transplantation for relapsed Hodgkin lymphoma*. *Blood*, 2017. **129**(18): p. 2471-2478.
44. Register, E.T., *Clinical trials for 2017-002194-18*.
45. Acquaviva, C., et al., *Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Paris–Robert Debré experience*. *Leukemia*, 2003. **17**(1): p. 241-246.
46. Kreyenberg, H., et al., *Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers*

- and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Tuebingen experience. *Leukemia*, 2003. **17**(1): p. 237-240.
47. Kreuzer, K.-A., et al. *Hämatologische Diagnostik*. 2018 05.2018; Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/haematologische-diagnostik/@@view/html/index.html>.
  48. Waterhouse, M., et al., *Early mixed hematopoietic chimerism detection by digital droplet PCR in patients undergoing gender-mismatched hematopoietic stem cell transplantation*. *Clin Chem Lab Med*, 2017. **55**(8): p. 1115-1121.
  49. George, D., et al., *Detection and quantification of chimerism by droplet digital PCR*. *Chimerism*, 2013. **4**(3): p. 102-8.
  50. Waterhouse, M., et al., *Droplet digital PCR for the simultaneous analysis of minimal residual disease and hematopoietic chimerism after allogeneic cell transplantation*. *Clin Chem Lab Med*, 2019. **57**(5): p. 641-647.
  51. Lange, T., et al., *Monitoring of WT1 expression in PB and CD34+ donor chimerism of BM predicts early relapse in AML and MDS patients after hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning*. *Leukemia*, 2010. **25**: p. 498.
  52. Kroger, N., et al., *Monitoring of the JAK2-V617F mutation by highly sensitive quantitative real-time PCR after allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis*. *Blood*, 2007. **109**(3): p. 1316-21.
  53. Bader, P., et al., *Monitoring of Minimal Residual Disease After Allogeneic Stem-Cell Transplantation in Relapsed Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Allows for the Identification of Impending Relapse: Results of the ALL-BFM-SCT 2003 Trial*. *Journal of Clinical Oncology*, 2015. **33**(11): p. 1275-1284.
  54. Absi, L., et al., *Early Mixed T-Cell Chimerism After Allogeneic Hematopoietic Stem Cells Transplantation Is Highly Predictive For Progression Free Survival*. *Blood*, 2013. **122**(21): p. 2079-2079.
  55. Le Bris, Y., et al., *Engraftment of Donor Cells after Allogeneic Stem Cell Transplantation: Comparison and Impact of Chimerism in Whole Blood and Peripheral CD3+ T-Cells*. *Blood*, 2016. **128**(22): p. 5866-5866.
  56. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. 3. Auflage 2009 ed. 2009: Georg Thieme Verlag.
  57. Grimaldi, F., et al., *Mixed T Cell Chimerism After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Severe Aplastic Anemia Using an Alemtuzumab-Containing Regimen Is Shaped by Persistence of Recipient CD8 T Cells*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2017. **23**(2): p. 293-299.
  58. Lim, Z.Y., et al., *Delayed attainment of full donor chimaerism following alemtuzumab-based reduced-intensity conditioning haematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndromes is associated with improved outcomes*. *Br J Haematol*, 2007. **138**(4): p. 517-26.

59. Thiede, C., et al., *Detection of relapse by sequential monitoring of chimerism in circulating CD34+ cells*. Ann Hematol, 2002. **81 Suppl 2**: p. S27-8.
60. Scheffold, C., et al., *Prediction of relapse of acute myeloid leukemia in allogeneic transplant recipients by marrow CD34+ donor cell chimerism analysis*. Leukemia, 2004. **18**(12): p. 2048-2050.
61. Bender, J.G., et al., *Phenotypic analysis and characterization of CD34+ cells from normal human bone marrow, cord blood, peripheral blood, and mobilized peripheral blood from patients undergoing autologous stem cell transplantation*. Clin Immunol Immunopathol, 1994. **70**(1): p. 10-8.
62. Guimond, M., et al., *Relapse after bone marrow transplantation: evidence for distinct immunological mechanisms between adult and paediatric populations*. Br J Haematol, 2000. **109**(1): p. 130-7.
63. Jiang, Y., et al., *Donor Chimerism of B Cells and Nature Killer Cells Provides Useful Information to Predict Hematologic Relapse following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0133671.
64. Arpinati, M., et al., *Increased donor CD86+CD14+ cells in the bone marrow and peripheral blood of patients with chronic graft-versus-host disease*. Transplantation, 2008. **85**(12): p. 1826-32.
65. Mollet, I., et al., *[Monitoring of chimerism in myeloid cells sorting of transplanted patients with acute myeloid leukaemia: a study from Lyon (France)]*. Pathol Biol (Paris), 2012. **60**(2): p. 106-11.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich noch bei den nachstehenden Personen bedanken, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Jürgen Löffler bedanken. Er ermöglichte es mir eine Arbeit in dem Feld anzufertigen, das ich schon sehr früh im Studium für mich entdeckte und in dem ich nun auch letztlich arbeite. Neben der kompetenten und freundlichen Betreuung bereicherte er die Arbeit mit vielen Ideen, die mir einen tieferen Einblick in die Thematik gaben.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Jan Springer, der bei Fragen stets ein offenes Ohr hatte und mir mit vielen Ratschlägen weiterhalf. Er war es auch, der mir das wissenschaftliche Arbeiten näherbrachte und dafür sorgte, dass ich Ergebnisse stets kritisch in Frage stellte.

Natürlich möchte ich mich auch bei dem ganzen Team der AG Löffler bedanken. Sie haben mich stets unterstützt, sei es bei der Einarbeitung in den Laboralltag, oder bei der flexiblen Zeitplanung mit den Gerätschaften.

Mein tiefer Dank gilt meiner Partnerin, Ann-Marie Drusenbaum, die mir gerade in der letzten Phase der Arbeit half, die notwendige Beharrlichkeit aufzubringen, um diese Arbeit zu beenden.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, ohne deren Unterstützung es niemals möglich gewesen wäre, diese Dissertation zu verfassen.

## **Curriculum Vitae**

### ***Persönliche Daten***

Name, Vorname : Kind, Sebastian  
Geburtsdatum : 29.09.1988  
Geburtsort : Landshut (Bay)  
Familienstand : Ledig, keine Kinder  
Telefon (mobil) : 0049 151 58713621

### ***Berufliche Ausbildung***

Seit 10/2019 : Assistenzarzt am Spitalzentrum Oberwallis im  
Bereich der Inneren Medizin  
08/2017 – 07/2019 : Assistenzarzt der Medizinischen Klinik I  
(Hämatologie/ Onkologie) des Universitätsklinikum  
Freiburg.

### ***Akademische Ausbildung***

01/2017 – 07/2017 : Ausarbeitung der Dissertation  
12/2016 : Abschluss des Medizinstudiums mit der  
Gesamtnote „Gut“  
09/2013 – 02/2014 : Erasmussemester am CHU Grenoble  
02/2013 – 09/2013 : Freisemester zur Arbeit an der Doktorarbeit im  
Bereich der Hämato-Onkologie in der Arbeitsgruppe  
von Prof. Dr. Jürgen Löffler  
10/2009 : Beginn des Medizinstudiums an der Julius  
Maximilians Universität Würzburg

### ***Zivildienst***

2008 – 2009 : Zivildienst im Klinikum Landshut

### **Schulische Ausbildung**

- 1999 – 2008 : Hans-Carossa Gymnasium Landshut  
1995 – 1999 : Peter und Paul Grundschule Landshut

### **Praktika**

- 06/2016 – 10/2016 : Drittes PJ-Tertial am Universitätsklinikum Hamburg  
Eppendorf  
03/2016 – 06/2016 : Zweites PJ-Tertial am CHU „La Meynard“  
11/2015 – 03/2016 : Erstes PJ-Tertial am Universitätsklinikum Heidelberg  
08/2014 – 09/2014 : Famulatur im Kinderkrankenhaus Landshut  
09/2013 – 02/2014 : Praktika am CHU Grenoble im Rahmen des  
Erasmussemesters  
03/2012 : Famulatur im Landeskrankenhaus Hall in Tirol

### **Sprachkenntnisse**

- Deutsch : Muttersprache  
Englisch : Fließend in Wort und Schrift  
Französisch : Fließend in Wort und Schrift  
Spanisch : Gute Kenntnisse  
Latein : Latinum

### **Sprachkurse im Ausland**

- 08/2012 : Französisch Sprachkurs in Bordeaux  
08/2008 : Französisch Sprachkurs in Paris  
08/2006 : Spanisch Sprachkurs in Barcelona

### **Hobbys**

- Aktives Mitglied des gemeinnützigen Vereins „Die Förderer“ e.V.  
Harfe  
Sport (Joggen, Klettern, Skifahren)

Visp, den 07.10.2019